

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année Scolaire 1931 - 1932 — N° 32

Travail de l'Institut Bactériologique de Lyon

LA TOXINE DYSENTÉRIQUE

Les notions actuelles

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTE de MEDECINE et de PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 23 Novembre 1931

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE

PAR

Paul WINCKEL

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Diplômé d'Hygiène et de Microbiologie

Né le 15 Juin 1908 à Nancy (Meurthe-et-Moselle)



IMPRIMERIE INTERSYNDICALE
LYONNAISE

46, Rue de l'Université, 46

Téléphone : Vaudrey 32-55

LYON

1931

La Toxine dysentérique

Les notions actuelles



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année Scolaire 1931 - 1932 — N° 32

Travail de l'Institut Bactériologique de Lyon

LA TOXINE DYSENTÉRIQUE

Les notions actuelles

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTE de MEDECINE et de PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 23 Novembre 1931

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE

PAR

Paul WINCKEL

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire de Lyon

Diplômé d'Hygiène et de Microbiologie

Né le 15 Juin 1908 à Nancy (Meurthe-et-Moselle)



IMPRIMERIE INTERSYNDICALE
LYONNAISE

46, Rue de l'Université, 46

Téléphone : Vaudrey 32-55

LYON

1931

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire	M. L. HUGOUNENQ.
Doyen	M. J. LEPINE.
Assesseur	M. ROLLET.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. CAZENEUVE, ROQUE, LANNOIS, HUGOUNENQ, ROCHET, BARRAL

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. PIC.
Cliniques chirurgicales.	PAVIOT
Clinique obstétricale et Accouchements	TIXIER
Clinique ophtalmologique.	BERARD
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	VORON
Clinique neurologique et psychiatrique.....	ROLLET
Clinique des maladies des enfants	NICOLAS
Clinique des maladies des femmes	LEPINE (J.)
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURIQUAND.
Clinique des maladies des voies urinaires.....	VILLARD
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie	COLLET
Clinique et prophylaxie de la tuberculose.....	GAYET
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie.....	NOVE-JOSSERAND
Chimie biologique et médicale	COURMONI.
Chimie organique et Toxicologie	CLUZET
Matière médicale et Botanique	FLORENCE
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	MOREL
Anatomie	MANCEAU.
Histologie	GUIART
Physiologie	LATARJET
Pathologie externe	POLICARD
Pathologie et Thérapeutiques générales	DOYON
Anatomie pathologique	LERICHE.
Chirurgie opératoire	FROMENT
Médecine expérimentale et comparée, et bactériologie	CADE
Médecine légale	FAVRE
Hygiène	PATEL
Thérapeutique	ARLOING (F.)
Pharmacie et Pharmacologie	Etienne MARTIN
Hydrologie thérapeutique et climatologie	X
	SAVY
	LEULIER
	PIERY

PROFESSEUR TITULAIRE SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Propédeutique de gynécologie M. CONDAMIN

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Anatomie topographique	MM. THEVENOT (Léon)
Puériculture et hygiène de la première enfance	RHENTER
Chirurgie expérimentale	TAVERNIER
Applications du radium	NOGIER
Stomatologie	TELLIER

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
NOGIER	CHALIER (Joseph)	ROCHET (Ph.)	CHAMBON
ROCHAIX	NOEL	WERTHEIMER	CIBERT
RHENTER	DUMAS	GATE	EPARVIER
MÄZEL	DUFOURT	BERNHEIM	GUILLEMINET
SANTY	DEVIC	DECHAUME	MORENAS
CHALIER (André)	GABRIELLE	POLLOSSON	REBATTU Ch.
	MARTIN (J.)		

EXAMINATEURS DE LA THÈSE :

MM. COURMONT, *Président* ; ROCHAIX, *Assesseur*

MM. CHALIER J. et GATÉ, *Agrégés*

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation,



A MON PERE

A MA MERE

A MA SŒUR

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MES CAMARADES

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE,
MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL COURMONT

*Professeur de Clinique Phthysilogique
et d'hygiène de la tuberculose.*

Directeur de l'Institut bactériologique de Lyon

Médecin des Hôpitaux.

Officier de la Légion d'honneur.

Il nous a appris à connaître et à
aimer l'hygiène et a bien voulu nous
autoriser à travailler à l'Institut bac-
tériologique.

Il nous a fait l'honneur d'accepter
la présidence de notre thèse. Nous lui
exprimons nos respectueux sentiments
d'admiration et de reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR ROCHAIX

Professeur d'hygiène à la Faculté de Médecine

Sous-Directeur de l'Institut bactériologique de Lyon

Chevalier de la Légion d'honneur.

Nous garderons un profond souvenir de ses brillantes leçons au diplôme d'hygiène, et nous le remercions d'avoir bien voulu accepter de faire partie de notre Jury de thèse.

A MES JUGES

A MONSIEUR LE MÉDECIN-COMMANDANT

LE BOURDELLES

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

Chevalier de la Légion d'honneur.

Nous le remercions d'avoir guidé nos premiers pas dans l'étude de la bactériologie, et de nous avoir prodigué ses conseils éclairés dans l'exécution de ce travail.

A MONSIEUR LE DOCTEUR P. SEDALLIAN

Ex-Chef de Clinique Médicale infantile

Chef de Service à l'Institut Bactériologique.

Il nous a inspiré ce travail.

Nous lui sommes très reconnaissant
de l'aimable accueil qu'il nous a ré-
servé dans son laboratoire et nous
l'assurons de notre profonde grati-
tude.

AU DOCTEUR PAUL RAMNOUX

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ

ET DES HOPITAUX CIVILS

A MES MAÎTRES

DE L'ECOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE

ET DES HOPITAUX MILITAIRES

Avant propos

Avant d'entreprendre la rédaction de ce modeste travail, nous exprimons tous nos sentiments de profonde reconnaissance et de gratitude envers nos Maîtres qui nous ont inspiré cette thèse et qui furent nos conseillers, Monsieur le Docteur Sédal'ian, et Monsieur le Médecin-Commandant Le Bourdellès. Nous n'aurons garde d'oublier Madame J. Clavel, à qui nous devons d'avoir pu mener à bien cette tâche. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'assurance de notre entier et respectueux dévouement.

Au moment de terminer notre vie d'étudiant, ce n'est pas sans une certaine émotion que nous jetons un regard sur les cinq années que nous venons de vivre au milieu de nos camarades, et nous saurons nous souvenir des heures inoubliables qu'ont pu nous réserver cette vie en collectivité et la présence de nombreux amis. Nous évoquerons tout particulièrement ceux, dont une intimité plus grande nous a permis d'apprécier les qualités de cœur et de dévouement, les Docteurs Ramnoux, Petiteau, Zeude, Pujos et Wagner.

Introduction

La toxine dysentérique est, parmi les toxines microbiennes, une des plus complexes et des plus mal connues. Notre but était de mettre au point un procédé de titrage de la toxine et de l'antitoxine dysentérique, préconisé en 1926 par la Commission d'hygiène de la Société des Nations. Par extension nous avons jugé intéressant de faire une revue générale des travaux publiés jusqu'à ce jour sur cette toxine. Enfin nous avons appliqué à la toxine dysentérique une technique conçue et utilisée sur la toxine diphtérique par MM. Leulier, Sédallian, Mlle Gaumond et Mme Clavel, et nous avons émis une hypothèse sur la formation et la constitution de la toxine dysentérique.

M. Sédallian nous a fait l'honneur de nous confier ce travail en 1929. Nous avons commencé notre expérimentation sous la direction de Monsieur le Médecin Commandant Le Bourdellès, puis après son départ, sous la direction de M. Sédallian à l'Institut bactériologique de Lyon.

Mais nous nous sommes heurtés à de multiples difficultés. Cette toxine, du fait de sa complexité, se comporte différemment des autres toxines vis-à-vis des méthodes couramment employées. Lors de nos essais de titrage, nos toxines n'ont pas toujours répondu à ce que nous étions en droit d'en attendre. Nous avons eu également des difficultés matérielles à nous procurer des souris ce qui a retardé nos titrages.

Néanmoins nous avons obtenu quelques résultats qui feront l'objet d'une partie de ce travail.

CHAPITRE PREMIER

Historique

Shiga en 1898 avait étudié la toxicité du bacille, auquel il donna son nom, en s'inoculant une culture tuée. Mais il fallait attendre encore cinq ans avant d'obtenir une toxine dysentérique.

LA TOXINE SOLUBLE

Ce pas fut franchi par Conradi, qui, en 1903, prépara, à partir d'un liquide d'autolyse de culture sur gélose, un produit toxique. C'était la toxine soluble.

Nous arrivons alors à une deuxième étape. Cependant que des auteurs, tels que Neisser et Shiga en 1904, Vaillard et Dopter en 1905, Kraus et Doerr en 1906, Kolle, Heller et de Mestral, Pane et Lotti, Flexner et Swet, Olitsky et Kligler, Seter en 1910, Neufeld, Shiga en 1922 et 1924, Patay en 1926, Pebrrie en 1928, Hosoya et Stephanopoulo en 1929 continuaient la mé-

thode de Conradi ; Rosenthal, dès 1904, marquait cette nouvelle étape.

Ce fut lui qui, le premier, filtra une culture en bouillon. Il eut ainsi une toxine soluble qui se montra tout aussi active pour le lapin que la toxine de Conradi. Le suivirent dans cette voie Todd (1906), Kraus et Doerr (1906), Kolle Heller et De Mestral (1908), Nicolle, Debains et Loiseau (1908), Fukuhara (1918), Marrian Perry et Copinger (1925), Patay (1926), Sardjito (1926), Dumas, Ramon et Saïd Bilal (1926), Przesmycki et Lipowska (1928) qui, les uns et les autres, en modifiant les conditions de milieu, de vieillissement, d'alcalinité, perfectionnèrent cette méthode et la mirent au point pour obtenir cette toxine dont l'étude fait l'objet de ce travail.

L'ENDOTOXINE

C'est la toxine incluse dans les corps microbiens. Tous les auteurs précédents ont plus ou moins tenté de l'obtenir, en particulier pour étudier son pouvoir antigène, comme nous le verrons plus loin.

Mais, si l'on en excepte Besredka (1906), et Nicolle, Debains et Jouau qui obtiennent une toxine microbienne en solution, c'est au Docteur Madsen, de Copenhague, que l'on doit la technique de préparation de la toxine sèche, technique qui sera reprise par la suite, dans son ensemble par les divers Instituts sérothérapeutiques, par Pebrie (1928), par Ionesco-Mihaesti et Combiesco.

ETUDE DE LA TOXINE DYSENTERIQUE

Nous venons de voir, au cours de ce rapide exposé qu'il existe deux toxines dysentériques, une toxine soluble ou exotoxine, obtenue par filtration d'un bouillon de culture, et qui représenterait un produit de sécrétion du bacille de Shiga, et une endotoxine incluse dans le corps microbien.

Ces deux toxines se sont montrées l'une et l'autre douées des propriétés inhérentes à toute toxine.

Nous les étudierons dans une revue très détaillée qui fera l'objet de ce travail, et dans l'ordre suivant :

- 1° Pouvoir toxique ;
- 2° Pouvoir antigène ;
- 3° Pouvoir de fixer l'antitoxine.

Dans chacun de ces articles nous aurons soin de scinder ces deux toxines, mettant en valeur les points qui les différencient, mais aussi ceux qui les rapprochent. Ensuite, dans une étude comparative avec les autres toxines et en particulier avec la toxine diphtérique, nous montrerons tout ce qui distingue de ces autres toxines, la toxine dysentérique qui est encore très mal connue. Posant dès maintenant le problème de *l'identité de la toxine soluble et de l'endotoxine*, nous tendrons, par cette étude et par l'appui de notre expérimentation personnelle non pas à le résoudre, ce qui paraît impossible, étant donné l'état actuel de nos connaissances, mais à en donner une explication basée sur l'interprétation logique et justifiée des faits.

CHAPITRE II

L'Activité toxique

Le pouvoir toxique d'une toxine se traduit par la dose minima mortelle (Lmn). C'est la plus petite dose de toxine qui injectée à un animal donné, le tue dans un temps variant de 24 à 48 heures. Avant d'entreprendre l'étude des doses d'activité toxique de la toxine dysentérique, nous envisagerons les diverses méthodes employées pour la préparer.

PREPARATION DE LA TOXINE

TOXINE SOLUBLE

1° Méthode de Rosenthal sur milieu liquide.

Ensemencement du bacille dysentérique de Shiga sur bouillon Martin, faiblement alcalin, largement aéré, que l'on porte à l'étuve à 37°. Plus la culture vieillit, plus il se forme de toxine, de sorte qu'après

trois semaines elle tue un lapin de 2 kg. à la dose de 0 cc. 2 en injection sous-cutanée, en 24 heures. Ce bouillon est filtré sur papier Chardin, puis sur filtre Pasteur. Le liquide filtré est clair et contient en solution la toxine.

2° *Sur milieu solide.*

Shiga (1924) prépare une émulsion en eau physiologique d'une culture sur gélose de 24 heures à raison de 0,002 mmg. de bacille pour 1 cc. d'eau. Il la chauffe pendant 1 heure à 60°, la laisse cinq jours à la température du laboratoire ; puis il la centrifuge et filtre le liquide surnageant, Lmn 0,05.

Hosoya et Stephanopoulo (1929) chauffent une émulsion en eau distillée à 58° pendant une heure, la laissent à la température du laboratoire 24 heures sous couche de toluène, filtrent sur terre d'infusoire et sur bougie Chamberland L3.

Pebrie (1928) laisse s'autolyser pendant onze à trente-trois jours à la glacière une émulsion en eau distillée, chloroformisée. Finalement elle est filtrée sur bougie d'amiante.

ENDOTOXINE

1° *Procédé Besredka.* Il émulsionne en eau physiologique une culture sur gélose de 48 heures, la tue par chauffage d'une heure à 60°, et la dessèche dans le vide. 0,4 gr. de bacilles sont mélangés avec 0,15 gr. de chlorure de sodium sec, puis triturés sur un mor-

tier d'agate, en ajoutant 20 cc. d'eau ; après centrifugation, le liquide surnageant renferme la toxine en solution.

2° *MM. Nicolle, Debains et Jouau* appliquent la technique de Mac Faydieu et Rowland. Les bacilles sont congelés au moyen d'air liquide, triturés dans un mortier avec du sulfate de soude fraîchement calciné, émulsionnés en eau physiologique et filtrés sur bougie.

3° *Le Docteur Madsen* de l'Institut de Copenhague prépare une toxine sèche étalon selon la technique suivante : Culture sur gélose de 48 heures, émulsionnée en eau physiologique, tuée par un chauffage à 58° pendant vingt minutes. Les corps microbiens obtenus par centrifugation sont desséchés, broyés, de nouveau desséchés et conservés dans le vide en tube scellé, en présence d'anhydride phosphorique.

LES ANIMAUX RECEPTEURS

Le nombre des animaux sur lesquels on peut se livrer à l'expérimentation de la toxine dysentérique est très restreint. Le cobaye, ce précieux animal de laboratoire, ne s'y prête pas, il est très peu réceptif.

Par contre nous avons à notre disposition deux espèces d'animaux qui présentent des avantages et des inconvénients réciproques, le lapin et la souris blanche.

LE LAPIN

Il faut autant que possible que les lapins aient un poids de 1.450 à 1.550 grammes (les animaux de 1.000 grammes étant considérés comme les plus résistants et ceux de 1.800 gr. les plus sensibles) qu'ils soient de même race ; les lapins noirs, de petite taille, à oreilles courtes sont les plus résistants (Patay). Un lapin est d'autant plus sensible à l'injection de toxine que son poids est plus élevé, comme nous venons de le voir, donc plus il est âgé, et réciproquement, plus il est jeune, mieux il la supporte (Ionesco-Mihaesti).

La voie intraveineuse semble constituer le mode d'inoculation le plus sévère dans les titrages des toxines solides ou liquides. Par cette voie les résultats sont relativement constants pour une même toxine chez des animaux de même poids.

D'autre part le lapin réalise très bien la maladie expérimentale.

Ces données, importantes déjà lorsqu'il s'agit de rechercher les doses d'activité de la toxine, entrent encore plus en ligne de compte dans les titrages de sérum ou de toxine par la méthode des mélanges. Il faut, dans ce cas, soumettre un grand nombre d'animaux à l'expérimentation et c'est ici que réside un des graves inconvénients du lapin, qui, étant donné son prix de revient élevé, rend les titrages très onéreux.

LA SOURIS

La dose de toxine à employer pour tuer une souris par la voie intraveineuse est, en chiffre relatif, d'un cinquième de la dose nécessaire pour tuer le lapin par la même voie : en chiffres absolus, c'est-à-dire rapportés au kilogramme d'animal sensible la souris est vingt fois moins sensible que le lapin à la toxine dysentérique pour les uns (Hirzfeld, Przesmycki-Pebrie), ou treize fois pour d'autres (Zangger).

Cependant la souris présente beaucoup moins de différences individuelles, les résultats sont plus constants. Il est plus facile au point de vue pratique de se procurer des souris de même poids et en nombre suffisant que des lapins et à des prix moins onéreux. Quoique délicate, leur manipulation ne présente pas de difficultés sérieuses. L'injection se fera intrapéritonéale, ou intraveineuse à la base de la queue. Il faut s'assurer que les souris soient saines au moment du titrage. Les souris inoculées sont soumises à des risques d'épidémies. Il se peut même que dans un certain nombre de cas, les souris aient augmenté leur résistance à la toxine à l'occasion d'une infection récente ou existante. On constate des variations saisonnières dans la réceptivité des souris.

En résumé, pour ces raisons, dans l'étude de la toxicité, et surtout des lésions expérimentales, il est préférable d'employer le lapin, réservant la souris pour les titrages, ces animaux ne donnant cependant pas encore une entière satisfaction.

Les doses toxiques

Une toxine telle que la toxine diphtérique est mortelle pour le cobaye, à une dose relativement fixe, de l'ordre de 1/500 de centimètre cube. Au contraire, la toxine dysentérique varie dans des conditions relativement considérables. Donner un tableau exact des doses toxiques serait impossible. Nous devons tenir compte de cette variabilité et examiner rapidement l'influence :

Du milieu de culture ;

De la durée de végétation ;

De l'aérobiose ;

Le l'alcalinité ;

De la chaleur.

Nous envisagerons dans chaque exposé :

1° Les toxines solubles : filtrats de bouillon, et filtrats d'autolysat.

2° Les endotoxines : émulsion de corps microbiens, ou bacilles broyés.

LE MILIEU DE CULTURE

1. — TOXINE SOLUBLE

Deux éléments constitutants du milieu doivent entrer en ligne de compte : la viande utilisée et les peptones :

a) *La viande.*

Rosenthal (1904), bouil. de veau. Lmn sur lapin 0.2 cc. en 48 h.
Shiga (1922) bouillon de cheval Lmn 0,1 à 0,005 cc.
Patay (1926) bouillon de veau. Lmn 0,05 cc.
Ionesco-Mihaesti (1922), bouillon de veau. Lmn 0,05 en 36 h.

b) *Les peptones.*

Beaucoup plus important est le choix des peptones à incorporer dans le bouillon, ou dans la gélose. Remarquons que les toxines obtenues sur milieu liquide ou sur milieu solide ont sensiblement la même toxicité. Le seul avantage que possèdent ces dernières réside dans leur rapidité de production : de trois à cinq jours.

Todd (1904) constate qu'un bouillon sans albumose ni peptone ne donne aucun produit toxique. Ludke (1906) revient au bouillon peptoné.

Krauss et Doerr (1906. Peptone de Witte. Lmn 0cc. 01 par kg.
Ionesco-Mihaesti (1922). Peptone de Byla. Lmn 0 cc. 05 en 36 h.
Shiga (1924) (toxine filtrée de 3 semaines) :

Peptone de Terruchi	Lmn	0 cc. 05	sur lapin
— de Witte	Lmn	0 cc. 01	
— de Riba	Lmn	0 cc. 05	
— d'albumine de sérum			
(digér. par des diast.)	Lmn	0 cc. 05	
— de globuline de sérum	Lmn	0 cc. 05	
— de fibrine	Lmn	0 cc. 01	
— de légume	Lmn	0 cc. 01	
— Chapoteaut	Lmn	0 cc. 005	

Patay (1926) :

Peptone Chapoteaut 1 %	Lmn	0 cc. 04
— Chapoteaut 2,5 % ..	Lmn	0 cc. 025

II. — ENDOTOXINE

Microbes tués par la chaleur (cultivés sur peptone Chapoteaut) injectés dans la veine du lapin en suspension microbienne de 2 cc. (Ionesco-Mihaesti) :

Lmn 0 mmgr. 15 + en 2 jours
Lmn 0 mmgr. 75 + en 36 heures

Microbes tués par la chaleur injectés dans la veine de la base de la queue de la souris (Ionesco-Mihaesti) :

Lmn 0 mmgr. 1 + en 24 heures

Shiga a expérimenté sur la souris avec une endotoxine provenant d'une culture à laquelle il avait ajouté de la peptone Chapoteaut :

Lmn 0 mmgr. 2 + en 24 heures

INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT DES CULTURES

I. — TOXINE SOLUBLE

Rosenthal (1904) constatait qu'une toxine filtrée le 4^e jour de végétation avait un Lmn de 5 cc., alors que filtrée le 21^e jour son Lmn était de 0 cc. 2. Todd ne filtrait qu'après 5 à 6 semaines. Leurs successeurs varièrent entre deux semaines (Kolle, Sardjito, Pátay) et trois semaines (Kraus et Doerr, Dumas, Pebrrie).

Voici les résultats des expériences de Shiga (1922) :

Toxine filtrée, la troisième semaine Lmn 0,1 à 0,2 cc.
— — — la quatrième semaine Lmn 0,05 cc.

II. — ENDOTOXINE

Reportons-nous à un autre tableau de Shiga où il envisage l'influence du vieillissement des cultures sur la production de toxine, en injectant directement au lapin le bouillon de culture. Ce bouillon contient non seulement l'exotoxine en solution mais encore les corps microbiens eux-mêmes.

Culture de 4 jours	..	Lmn 0,1 à 0,05 cc.	par kg. de lapin		
— de 8	—	..	Lmn 0,05 à 0,025 cc.	—	—
— 15	—	..	Lmn 0,025 à 0,01 cc.	—	—
— 3 semaines.		Lmn 0,025 à 0,05 cc.	—	—	—
— 4	—	Lmn 0,05 cc.	—	—	—

Par contre si l'on râcle, un produit de culture sur gélose de 48 heures, on constate que les corps microbiens sont déjà très toxiques.

D'après ce tableau il semble bien que la toxicité atteint son maximum entre la 2^e et la 3^e semaine. Il y a corrélation entre la progression de la toxicité dans le bouillon et dans la toxine filtrée.

INFLUENCE DE L'AÉROBIOSE ET DU VOILE

L'aérobiose la plus stricte est nécessaire, pour qu'un milieu,ensemencé de bacilles de Shiga, soit toxigène. Ce fait avait déjà été constaté par Rosenthal. Mais Klein insiste nettement en 1906 sur les relations qui peuvent exister entre ce voile recouvrant la surface du bouillon, témoin de l'aérobiose et la toxicité. Aussi Kraus et Doerr ont-ils soin de répartir leur bouil-

lon à raison de 2 litres par flacon de 5 litres. Nous avons par ailleurs un fait très démonstratif dans l'expérience de Myrrian Perry et Copinger (1925) ; ils ont démontré qu'un bacille de Shiga cultivé en anaérobiose se montrait complètement atoxique.

INFLUENCE DE L'ALCALINITÉ DU MILIEU ET DU PH

On savait que le bacille dysentérique demandait, comme les autres microbes, un léger degré d'alcalinité pour pousser. Rosenthal et Ludke employaient déjà un bouillon alcalin. Kraus et Doerr demandent plus de précisions : ils additionnent leur bouillon de 30 cc. de soude à 10 %, par litre.

Peu à peu à la notion simple de l'alcalinité, vient de substituer une notion plus scientifique, la notion du PH.

Olitsky et Kligler en 1920 étudient la courbe de variation du PH par rapport à la courbe de production de toxine, sans préciser néanmoins le PH optimum de l'ensemencement. En 1922 Ionesco Mihaesti et Popesco montrent que la toxicité arrivait à son optimum au PH 8,4, 0 cc. 05 tue un lapin en 36 heures. Hirzfeld est, par contre, moins catégorique ; il note que l'alcalinité optima varie entre 7,5 et 8,4. Shiga (1924), Patay (1926), alcalinisent au PH 8,4, tandis que Sardjito (1926) obtient une toxine très active au PH 7,5.

Ionesco, Mihaesti et Dambovicéanu ont montré que la toxine dysentérique jouit à ce point de vue d'une tolérance très large, par rapport à d'autres toxines,

puisque'elle garde son pouvoir toxique entre PH 2,15 et PH 11. Il n'en est pas moins vrai qu'aux PH extrêmes la toxicité de la toxine dysentérique est fortement atténuée.

Les auteurs ne sont donc pas d'accord. Cette dernière expérience semble prouver que le bacille de Shiga s'accomoderait facilement d'une alcalinité moyenne et qu'il est aussi toxigène entre les PH 7,5 et 8,4.

INFLUENCE DES SOUCHES MICROBIENNES

Les diverses souches de bacilles dysentériques sont très inégalement toxigènes. Cela peut provenir de leur âge, d'un trop grand séjour en cultures mal conditionnées. Kraus et Doerr insistaient déjà sur ce fait. Ils avaient une souche éminemment toxigène, la souche Krusa II. Plus récemment Ionesco-Mihaesti et Combiesco ont utilisé avec succès une souche de Shiga.

Nous avons eu personnellement l'occasion d'utiliser plusieurs souches, en particulier une souche provenant des laboratoires de l'Institut Bactériologique de Lyon et qui tuait un lapin de 2 kg. 800 en 48 heures à la dose de 0 cc. 1 et une souche du Val-de-Grâce qui s'est montrée moins toxique.

Il est donc important d'avoir — mais difficile à se la procurer — une souche très toxigène, pour préparer une toxine soluble ou une endotoxine.

En résumé, pour obtenir une toxine active, il faut partir d'une souche très toxigène, la cultiver sur bouil-

lon, si l'on veut avoir une toxine soluble, sur gélose, si l'on désire une toxine microbienne (corps microbiens). A ce milieu il faut ajouter de la peptone Chapoteaut dans la proportion de 2,5 % ; et l'ajuster à un PH moyen entre 7,5 et 8,4. Il faut autant que possible cultiver en milieu très aéré, dans des ballons à fond plat et évasé. Le titrage de la toxine sera effectué soit sur le lapin, soit sur la souris. Ionesco-Mihăiescu a montré que la voie intraveineuse était la plus active sur ces deux animaux :

TOXINE LIQUIDE

Lapin, voie intraveineuse ..	Lmn = 0 cc. 01	+ en 36 h.
— — intrapéritonéale.	Lmn = 0 cc. 06	+ en 3 j.
Souris, voie intraveineuse ..	Lmn = 0 cc. 0025	+ en 48 h.
— — intrapéritonéale.	Lmn = 0 cc. 01	+ en 48 h.

ENDOTOXINE (Microbes tués)

Lapin :

voie intraveineuse ..	Lmn = 0 mmgr. 025	+ en 36 h.
intrapéritonéale.	Lmn = 0 mmgr. 20	+ en 16 h.

Souris

voie intraveineuse ..	Lmn = 0 mmgr. 05	+ en 4 j.
— intrapéritonéale.	Lmn = 0 mmgr. 20	+ en 3 j.

Expériences personnelles

Nous avons recherché les doses d'activité toxique de plusieurs souches sur lapin et souris et nous avons constaté de variations considérables.

TOXINE SOLUBLE

TITRAGE SUR LAPIN.

22 Mars 1929 :

1. B.5, bouillon de 1 semaine (s.-cut.) 2 cc. = + 36 h.
2. B.3, toxine de 1 semaine (s.-cut.) 2 cc. = + 36 h.

12 Avril 1929 :

1. B.6, bouillon de 25 jours (s.cut.) 2 cc. = + 24 h.
2. B.7, toxine de 25 jours (s.-cut.) 2 cc. = + 24 h.

27 Mai 1929 :

- B.5, toxine de 3 semaines (s.-cut.) 0 cc. 2 = survie

25 Juin 1929 :

- B.8, toxine de 3 semaines (s.-cut.) 0 cc. 1 = survie

3 Juillet 1929 :

- A/60, toxine de 4 semaines (intra-vein. 0 cc. 15 = + 24 h.

16 Juillet 1929 :

- A.81, toxine de 4 semaines (intra-vein.) 0 cc. 2 = + 48 h.

12 Août 1929 :

- A.95, toxine de 3 semaines (intra-vein.) 0 cc. 2 = survie
A.96 — — — 0 cc. 1 = + 4 j.

5 Octobre 1929 :

- B.13, toxine de 3 semaines (intra-vein.) 2 cc. = + 48 h.
A.91 — — — 0 cc. 5 = + 3 j.
B.8 — — — 0 cc. 2 = survie
A.70 — — — 0 cc. 1 = + 3 j.

Mars 1930 :

B.27, toxine de 1 semaine (intra-vein.)	0 cc. 1	= + 24 h.
B.25 — — — — —	0 cc. 5	= survie
B.24 — — — — —	1 cc.	= + 5 j.
B.30, toxine de 2 semaines (intra-vein.)	0 cc. 1	= + 48 h.
B.31 — — — — —	1 cc.	= + 4 j.

TITRAGE SUR LA SOURIS DE 15 GR.

Juillet 1931 :

1. Souris, toxine de 3 semain. (s.-cut.)	0 cc. 0005	= survie
2. — — — — —	0 cc. 01	= —
3. — — — — —	0 cc. 02	= —
4. — — — — —	0 cc. 04	= —
5. — — — — —	0 cc. 2	= —
6. — — — — —	0 cc. 5	= —
7. — — — — —	1 cc.	= + 48 h.

ENDOTOXINE

Nous avons préparé cette endotoxine en émulsionnant en eau physiologique des cultures sur gélose de 48 heures, et en les centrifugeant. Cette toxine (corps microbiens) contient encore, après centrifugation rapide, de 80 à 90 % d'eau. Par conséquent les poids que nous donnons ci-dessous n'ont pas une valeur absolue, mais une simple valeur comparative.

Juillet 1931 :

I. — 1. Souris, endotoxine (s.-cut.)	0 mmgr. 25	= survie
2. — — — — —	0 mmgr. 50	= —
3. — — — — —	1 mmgr.	= —
4. — — — — —	1 mmgr. 5	= —
5. — — — — —	2 mmgr.	= —
6. — — — — —	10 mmgr.	= —
7. — — — — —	15 mmgr.	= + 48 h.
8. — — — — —	30 mmgr.	= + 48 h.
9. — — — — —	45 mmgr.	= + 48 h.
10. — — — — —	60 mmgr.	= + 48 h.

Octobre 1931 :

II. — 1.	Souris,	endotoxine (intr.-périt.)	2 mmgr. = + 3 j.
2.	—	—	5 mmgr. = survie
3.	—	—	8 mmgr. = + 36 h.
4.	—	—	10 mmgr. = + 48 h.
5.	—	—	15 mmgr. = + 20 h.
6.	—	—	20 mmgr. = + 36 h.
7.	—	—	30 mmgr. = + 24 h.

Toxicité chez l'homme

ENDOTOXINE

C'est un fait acquis que l'endotoxine se montre active chez l'homme.

Shiga, en 1898, contracte la dysenterie en absorbant une culture tuée.

Kruse et Ludke ayant pris, par mégarde, une culture de bacille dysentérique contractent également la maladie.

Strong et Musgrave, aux Philippines, font ingérer à un condamné à mort une culture de bacille dysentériques ; six heures après il fut atteint des symptômes classiques de la dysenterie.

La clinique nous donne des exemples nombreux d'épidémies de dysenterie, bactériologiquement diagnostiquées.

TOXINE SOLUBLE

La toxicité de la toxine soluble chez l'homme a été démontrée par des auteurs qui ont cherché à avoir

une réaction, semblable à la réaction Schick, pour dépister les sujets plus particulièrement réceptifs à la dysenterie bacillaire.

INTRADERMO-REACTION A LA TOXINE DYSENTERIQUE

Broleman publia les premiers essais, suivi bientôt de Brokmann (1925) qui faisait une injection intradermique de 0 cc. 1 d'une dilution à 3 % d'une toxine tuant le lapin à 0 cc. 1 par kilogramme. Au bout de quelques heures on voyait apparaître une tache rouge vif puis bleue. Au bout de 48 heures on observait parfois une petite hémorragie suivie d'une escharre.

Les sujets à réaction négative n'avaient qu'une petite rougeur. La réaction était positive dans 80 % des cas.

Brokmann et Przesmycki (1925) constatent que les nouveaux nés réagissent en moins grand nombre que les enfants plus âgés.

En 1926 Zoeller et Lebre pratiquent des intradermo-réactions avec une toxine provenant d'une culture de Shiga filtrée au 20^e jour, culture exaltée par passage en sac de collodion. Ils injectent 0 cc. 2 d'une dilution au 1/150 en eau physiologique. Le lendemain on observe une rougeur, la deuxième semaine une escharre noire qui tombe et laisse une cicatrice grise. Mais les auteurs ont constaté que la réaction sur le lapin ne permet pas de préjuger de l'état d'immunité ou de réceptivité.

La maladie expérimentale

Quelque soit le mode d'introduction, voie sous-cutanée ou intraveineuse, cette dernière étant cependant préférable, l'injection de toxine dysentérique produit chez le lapin de 2kgs une maladie expérimentale très intéressante.

Le tableau en a été remarquablement brossé par Vaillard et Dopfer (1905) qui utilisèrent des corps microbiens, une endotoxine.

Le lapin devient malade 8 à 12 heures après l'injection ; au point d'inoculation apparaît un léger œdème. La température s'élève, puis le lapin devient abattu, son poil se hérisse, il ne prend pas de nourriture. Il a des selles diarrhéiques de plus en plus fréquentes et parfois sanguinolentes: il réalise le tableau de la dysenterie humaine. Vers le troisième jour apparaît une paralysie du train postérieur, suivie parfois d'une paralysie du train antérieur. La température descend à 30°, et le 3° ou 4° jour l'animal succombe avec une diminution de poids notable.

A l'autopsie, on découvre deux ordres de lésions : intestinales et nerveuses.

LESIONS INTESTINALES

1° Macroscopiquement le gros intestin est œdématisé, la surface de la muqueuse est hyperémiee et parsemée de suffusions hémorragiques souvent même de foyer nécrotique ou d'ulcérations punctiformes, surtout au niveau des replis.

Quand ces foyers se détachent, ils sont remplacés par des ulcérations irrégulières à bords anfractueux dont le fond est constitué par un tissu friable sanieux, comme gangrené.

L'intestin grêle est relativement sain, simplement hyperémié et rempli d'un liquide diarrhéique : les lésions cœcales ne débutent qu'à la face inférieure de la valvule de Bohin. Le péritoine est congestionné et recèle une exsudat séreux.

2° A l'examen microscopique, on découvre une desquamation du revêtement épithélial, une hypersécrétion des glandes tubulaires, épaissement du tissu adénoïde par infiltration de plasma, de leucocytes et de globules rouges ; hyperémie considérable des vaisseaux, altération de leurs parois, extravasation sanguine dans les tissus inter et sous-glandulaire de la muqueuse et de la portion supérieure de la cellulose, œdème de la cellulose, îlots de nécrose pouvant atteindre la base des glandes.

La rate est normale ; le rein et le foie présentent parfois une légère dégénérescence graisseuse.

Suzaki a recherché l'influence de la toxine sur les diverses portions de l'intestin de lapins d'âges différents.

Chez le lapin de 10 jours, le duodénum, le jéjunum et l'iléon, soumis à l'action de cette toxine, ont des contractions répétées et exagérées ; par contre, le gros intestin a des mouvements faiblement accélérés.

Chez les lapins de 24 à 25 jours, la toxine agit de la même façon sur l'intestin grêle, alors qu'elle reste sans action sur le gros intestin.

Chez les lapins de 50 jours ou plus, la toxine provoque des contractions exagérées du duodénum et du jéjunum ; elle n'a aucun effet sur l'iléon et le gros intestin dont le péristaltisme est même ralenti.

L'ENTEROTROPISME

On a donné ce nom à cette action élective de l'endotoxine sur l'intestin. Des auteurs ont prétendu que seule l'endotoxine était douée d'entérotropisme, la toxine soluble ou exotoxine ne donnant peu ou pas de lésions intestinales ; nous verrons plus loin la part qu'il faut faire de cette argumentation. Cet entérotropisme réalise absolument la maladie humaine.

LESIONS NERVEUSES

A côté de cet entérotropisme, la toxine dysentérique présente expérimentalement sur le lapin un neurotropisme remarquable.

Les paralysies existent dans plus de 80 % des cas ; elles débutent le 3^e jour. Ce sont habituellement des paraplégies à marche généralement ascendante, atteignent d'abord le train postérieur, pour toucher ensuite le train antérieur, quoi qu'il se produise parfois l'inverse. Elles sont accompagnées de paralysies vésicales, on peut même avoir des hémiplegies spinales.

L'autopsie et l'histologie montre l'intégrité absolue des nerfs et des racines rachidiennes. Par contre on observe des altérations de la moelle, diffuses ou de préférence localisées. Parfois seule la moelle lombai-

re est lésée, souvent toute la moelle est envahie, les lésions intéressant exclusivement l'axe gris et les cornes antérieures : elles consistent en de véritables foyers de ramollissement, état chromophylique des éléments cellulaires et chromatolyse aboutissant à la destruction complète de ces éléments et des fibres myéliniques ; parfois envahissement des centres protubérantiels et même des cordons blancs, vaisseaux dilatés à l'extrême, bourrés des éléments normaux du sang, sans altération de leur paroi, hémorragie interstitielle.

En résumé on observe un véritable syndrome poliomyélitique qui explique les signes cliniques : paralysies et paraplégies du type ascendant.

Le cobaye est réfractaire à la toxine dysentérique. La souris blanche de 15 grammes réalise un tableau clinique semblable à celui du lapin.

TOXINE SOLUBLE

Les premières observations sur la maladie expérimentale du lapin par la toxine soluble sont dues à Rosenthal. Elle reproduit exactement les mêmes lésions que l'endotoxine. De nombreux auteurs l'ont démontré depuis, et nous avons pu le contrôler nous-même au cours de notre expérimentation sur les lapins.

Une certaine restriction peut résider dans ce fait qu'une toxine jeune (filtrat de 5 jours par exemple) peut ne pas produire de signes cliniques, mais toujours elle provoque des lésions intestinales décelables par l'autopsie.

Conclusion

Cet exposé nous a montré qu'il existait deux toxines dysentériques que l'on peut étudier parallèlement. Elles se différencient essentiellement par leur mode de préparation et par leur aspect.

D'une part la toxine soluble que l'on peut obtenir soit en filtrant un bouillon de trois semaines, le produit toxique soluble passant seul à travers le filtre ; soit en émulsionnant une culture sur gélose et en filtrant après l'avoir laissée s'autolyser pendant quelques jours. Cette dernière toxine qui est une toxine absolument comparable à la première a été appelée à tort endotoxine par certains auteurs (Olitsky et Kligler). A tort ou à raison d'ailleurs, ce n'est qu'une question de définition. Nous verrons plus loin ce qu'il faut en penser.

D'autre part, nous avons, en brôyant les corps microbiens, une toxine sèche, celle que nous appelons l'endotoxine proprement dite.

Cependant ces deux toxines se montrent *également toxiques* envers la souris et le lapin. Elles subissent des variations de toxicité superposables suivant que l'on s'adresse aux voies sous-cutanées, intrapéritonéale, ou intraveineuse. Elles obéissent aux *mêmes influences de milieu* : alcalinité, aérobiose, peptone, souche microbienne. Chez l'homme elles se montrent l'une et l'autre virulentes. Que l'on injecte à l'animal une toxine soluble ou des corps microbiens il con-

tractera la même maladie expérimentale dans laquelle nous retrouverons le même ordre de lésions intestinales ou nerveuses.

Devant cet ordre de fait il est logique de se poser la question de *l'identité* de ces deux toxines. Un point seulement les différencie : la toxine soluble n'est virulente qu'après deux ou trois semaines de culture, les corps microbiens sont toxiques au bout de 48 heures de culture. Peut-être est-ce un argument de plus en faveur de l'identité.

Mais nous devons insister sur les variations considérables des doses d'activité, déjà signalées par les auteurs, et que nous avons nous-mêmes retrouvées au cours de nos opérations de titrage de toxine.

Une même toxine soluble qui aux doses de 0 cc. 1, 0 cc. 5 et 2 cc. tue le lapin en 48 heures, le respecte à la dose de 0 cc. 2. Dans une autre expérience, il nous faut 1 cc. de toxine pour tuer la souris, alors que la dose minima mortelle est habituellement de 0 cc. 01 par la voie intrapéritonéale. Nous observons les mêmes variations avec l'endotoxine : avec la même souche, une série de souris succombera par une injection de corps microbiens à doses croissantes à partir de 2 mmgr., tandis qu'une autre série exigera comme dose mortelle 15 mmgr. d'endotoxine. Influence des animaux, certainement, mais influence aussi du milieu, et de multiples causes qui nous échappent.

CHAPITRE III

Le Pouvoir antigène

Historique

Le pouvoir antigène, propriété remarquable de la toxine qui, dans l'organisme qu'elle menace, provoque le développement d'anticorps, sous les coups desquels, elle va bientôt succomber, ne manqua pas d'être étudié dès la découverte du bacille de Shiga.

En 1898, Shiga réalisait les premiers essais de vaccination. Gabritchewski, Neisser et Shiga, Todd en 1903, Rosenthal en 1904, publièrent leurs travaux sur le pouvoir antigène de la toxine soluble. Et parallèlement aux recherches de Olitsky et Kligler (1920), Skschivau et Stephansky (1907) et d'autres auteurs, Kraus et Doerr (1906), Vaillard et Dopter (1906), Kolle Heller et De Mestral (1907), Dopter (1907), Coyne et Anchi (1908), Flexner et Arnos (1916), Bugwid (1921), etc... mettent en évidence le pouvoir antigène des corps microbiens.

A ce moment nous entrons dans une nouvelle étape. On tente par divers procédés d'atténuer les toxines, mais, n'anticipons pas.

ETUDE DU POUVOIR ANTIGENE

Deux méthodes se présentaient pour étudier, chez l'animal le pouvoir antigène.

La première en date, celle qui venait immédiatement à l'esprit, consistait en l'injection à doses croissantes de toxines ; la seconde, appliquée à l'exemple des travaux précédents sur les autres toxines, les méthodes d'atténuation.

INJECTIONS A DES DOSES CROISSANTES

TOXINE SOLUBLE

Rosenthal tente d'immuniser un chien avec du filtrat de bouillon. Neisser et Shiga, puis Todd déterminent chez le lapin la production d'un sérum, ce dernier auteur commençant par 0 cc. 5 de toxine et continuant à doses croissantes pendant quatre mois.

Skschivau et Stefansky, en 1907, obtiennent en un an sur le cheval un sérum antidysentérique par injection d'un filtrat de bouillon de trois semaines, cependant qu'Olitsky et Kligler utilisent un filtrat de bouillon de cinq jours.

Shiga (1924) emploie également un filtrat de bouillon de trois semaines : il obtient un sérum qui neutralise 20 doses mortelles, au 1/30.

Dans l'ensemble les résultats furent satisfaisants, fait important, et toujours, le sérum produit fut actif. Néanmoins l'emploi de toxine microbienne eut, semble-t-il, plus de vogue.

ENDOTOXINE

Kruse (1901) prépare un sérum de mouton, puis d'âne et de cheval par injection de bacilles vivants à de très petites doses.

Gabritschewski (1903) utilise les deux toxines variant de 0 cc. 5 à 5 cc. soit au total 28 cc. 5. Dans les 22 jours qui suivirent, l'animal reçoit en 5 fois de 0 cc. 5 à 5 cc. de bacilles vivants. Ensuite il reçoit alternativement de la toxine et du bouillon pendant 10 mois. Le sérum était très actif.

Rosenthal (1904), reprend ces expériences, et produit un sérum de cheval, actif, puisqu'il l'emploie en thérapeutique humaine, par injection de cultures mortes puis vivantes.

Kraus et Doerr, Vaillard et Dopfer (1906), immunisent des chevaux par doses croissantes de bacilles vivants et de filtrat toxique, sans grand résultat. L'un des chevaux meurt.

En 1907, Kolle, Heller et De Mestral, ainsi que Dopfer, émettent l'idée que les corps microbiens et la toxine soluble produisent des sérums de valeur égale.

Coyne et Anchi, en 1908, Flexner et Arnoss, en 1916, préparent des sérums polyvalents anti-Shiga et anti-Flexner, les premiers au moyen de corps microbiens et de toxine soluble, les autres au moyen de bacilles

injectés dans les veines : en 10 semaines le cheval produit, dans le dernier cas un sérum qui neutralise une dose mortelle (Lmn) de Shiga à la dose de 0 cc. 008.

Bugwid, en 1921, immunise des chevaux par émulsion de cultures jeunes à doses croissantes de 2 mmgr. à 800 mmgr.

Hirzfeld emploie la toxine sous-cutanée, ou des bacilles tués.

Shiga, en 1922, prépare un sérum par injection sous-cutanée de doses croissantes d'une suspension en eau physiologique à 0,85 % de bacilles sur gélose de 24 heures, tués par la chaleur : 30 minutes à 60°.

En 1924, dans son rapport, sur la standardisation des sérums antidysentériques, il utilise une émulsion en solution salée d'une culture sur gélose de 24 heures chauffée 1 heure à 60° (1 cc. de suspension contenant 2 mmgr. de microbes) : 1/200 du sérum obtenu neutralise 20 doses mortelles de toxine.

METHODES D'ATTENUATION

Même en commençant par de petites doses que l'on augmentait progressivement, les résultats obtenus ne paraissaient pas satisfaisants. Les toxines, endotoxine ou toxine soluble s'avéraient trop virulentes. Il devenait nécessaire de trouver un moyen d'atténuer, voire même de supprimer ce pouvoir toxique, tout en conservant intégralement le pouvoir antigène.

ENDOTOXINE

Shiga, au début, se servit de cultures tuées. Les troubles locaux et généraux étaient encore trop nombreux pour que la méthode fut employée. Elle fut reprise avec plus ou moins de succès par d'autres auteurs qui chauffèrent les bacilles à 56° (Ruffec et Willmore, Lucksch, etc...).

L'atténuation par la chaleur ne répondant pas aux espoirs que l'on avait fondé sur cette méthode, on utilisa toute la gamme des agents chimiques : C'est ainsi que l'on tenta d'atténuer la toxicité des corps microbiens, par l'iode (Ranque et Senez), l'eusol (Déan et Adamson), le fluorure de sodium (Nicolle et Blaizot), le chlorure d'or (Violle), un sel de terre rare, le sulfate de Leuthane (Frouin et Moussoli), le sulfate de soude (M. Nicolle, Debains et Loiseau, 1916), l'antiformine (Jotter 1920), l'éther (H. Vincent).

TOXINE SOLUBLE

On pensa atténuer la toxine soluble par le vieillissement et la fermentation. Déjà Doerr avait fait vieillir une toxine en présence de levain et l'avait rendu atoxique : de plus il aurait conservé le pouvoir immunisant d'une toxine, tout en lui faisant perdre sa toxicité par l'action des acides.

Quelques années plus tard, en 1914, Kirschchbaum, par le même procédé, avec une toxine purifiée put immuniser un lapin.

L'ANATOXINE

Il faut en arriver aux travaux de Lowenstein et de Ramon, sur l'anatoxine diphtérique pour voir les auteurs aiguiller leurs recherches dans cette nouvelle voie. On sait que pour atténuer la toxine diphtérique, Lowenstein se servit du formol qu'il fit agir simultanément à la lumière ou à la chaleur à 30°. Ses résultats ne furent pas satisfaisants, la quantité de formol était insuffisante ; le lapin mourait si l'on dépassait 10 doses mortelles : la toxicité n'était pas assez atténuée, l'immunité inexistante.

En 1923, Ramon fit agir simultanément pendant vingt-et-un jours sur le filtrat d'une culture en voile de Park et William n° 7 sur bouillon Martin la solution de formol du commerce à 40 % à la dose de 3 0/00 et la chaleur à 37°. Le produit obtenu immunise infailliblement le cobaye en trois injections. Des résultats similaires marquèrent les essais de Ramon et Zoeller sur l'anatoxine tétanique.

Lesbre et Verdeau, en 1924, tentent d'obtenir selon la même technique une anatoxine dysentérique : les premiers essais échouèrent en partie : ils filtrèrent une culture de 3 semaines sur bouillon Martin ; ils y ajoutèrent du formol à 3 0/00 et la portèrent à l'étuve à 40° pendant 20 jours : l'anatoxine était tolérée par le lapin à la dose de 2 cc., sous-cutanée, mais une troisième injection de 8 cc. provoquait de l'amaigrissement et une paralysie transitoire. Cette anatoxine était instable car une nouvelle addition de formol, ou de 2 % de lessive de soude augmente la toxi-

cité. Cependant en portant à 6 0/00 la quantité de formol, on avait une toxine stable qui protégeait le lapin en deux inoculations à 7 jours d'intervalle et sans aucune réaction de la part de l'animal, au contraire une seule dose même supérieure à la totalité des deux précédentes ne donnait qu'une ébauche d'immunité.

A Moscou, Glotow filtre sur papier un bouillon peptoné au PH 8,4, l'additionne de formol à 4 0/00 et le chauffe 35 jours à 40°. Sur lapin, avec cette anatoxine, les voies sous-cutanées et intraveineuses donnent, prétend-il, plus d'immunité que la voie intradermique ou intestinale.

Un auteur brésilien, Arlindo de Assis tente de préparer une anatoxine ; mais il y a des irrégularités dans le produit qu'il obtient. Néanmoins, il conclut au pouvoir antigène de cette anatoxine.

En 1926, Dumas, Ramon et Saïd Bilal, partant d'un filtrat de bouillon avec 10 0/00 de peptone Chapoteaud — 1 cc. d'une dilution au 1/25 de ce filtrat provoque la mort du lapin — l'additionnent de formol à 6 0/00 et le portent à l'étuve à 37°. Le 15° jour, 5 cc. tuaient le lapin en cinq jours ; le 30° jour le lapin supporte 10 cc. ; il présente de l'inappétence le jour de l'injection, puis reprend sa vie normale. Le pouvoir antigène de cette anatoxine est altéré par le chauffage à 65° pendant 3/4 d'heure ; mais elle le conserve pendant un an au moins en tube scellé et à l'abri de la lumière.

C'est en suivant cette technique que nous avons préparé l'anatoxine qui nous servit au cours de notre expérimentation. Nous avons filtré sur filtre Pasteur,

un bouillon ordinaire de 21 jours, additionné de 2, 5 % de peptone Chapoteaut, au PH 7,5. Le filtrat fut ensuite formolé à 60/00 et porté à l'étuve à 37° pendant 3 semaines. On obtient un liquide limpide jaune qui immunise le lapin et même à haute dose ne provoque aucune réaction grave.

ANATOXINE TOTALE

On peut de même, dans certaines conditions, produire une anatoxine en partant d'une endotoxine. Glotow, Patay (1926) avaient préparé une anatoxine; ce dernier auteur l'avait même incorporé en véhicule huileux. De même, Lurge, Rosenbaltt et N. Kossarew (1930) transforment une émulsion de bacilles dysentériques en un anavaccin atoxique, utilisable chez l'homme et chez l'animal, les préservant contre plusieurs doses mortelles de bacilles de Shiga.

Il semble possible que le formol agisse en bloquant les éléments NH^2 de la toxine. Cependant, cette action paraît s'exercer, d'après Leulier, Sédallian, et Mme Clavel, non pas sur la toxine elle-même, mais sur les protides non spécifiques du milieu. En effet, une toxine purifiée est détruite par le formol et perd ses propriétés antigènes, et tout se passe comme si une anatoxine ne pouvait être obtenue que s'il existe du côté de la toxine une substance peptonée protectrice. Quelque soit la nature des éléments toxiques, ils doivent, pour Velluz (1929), participer alors à des molécules plus complexes réalisées par la condensation partielle des molécules protéiques du milieu. Sans modi-

fication chimique propre, ils perdent le caractère réactionnel par un mécanisme comparable à celui de l'empêchement sérique.

En somme, dans ce cas particulier, la toxine dysentérique semble se comporter comme la toxine diphtérique. Elle semble, par le fait que l'on puisse préparer une anatoxine, posséder des éléments atoxiques : Pebrie (1928) a jugé intéressant de voir s'il n'existait pas dans cette toxine, comme dans la toxine diphtérique, des toxoïdes. On sait que ces toxoïdes représentent, d'après la théorie d'Erlich, le constituant atoxique de la toxine qui a le plus d'affinité pour l'antitoxine. Pour Bordet, ces toxoïdes n'existent pas en temps qu'élément libre, mais cet auteur constate que, le mélange toxine-antitoxine se faisant en proportion variable, il y a dans ce mélange des stades d'atténuation progressive. Pebrie a démontré qu'il existe des toxoïdes dans l'endotoxine et dans la toxine soluble, peut-être en proportion un peu moins grande dans cette dernière. Enfin, plus récemment, Schlossberger et Harkoch ont conclu à l'existence de substances atoxiques et fixant l'antitoxine.

Atténuation par les fermentations alcooliques

Renouvelant une tentative faite par Nobécourt en 1900, Alex Comis a pu atténuer une toxine dysentérique par une fermentation alcoolique. Il faisait agir simplement sur la toxine une levure (*saccharomyces ellipsoïdus*), ou bien il ensemençait la toxine préalablement additionnée d'un volume égal de liquide de Hansen, dans lequel le maltose remplaçait le glucose.

La culture est maintenue à 28°, et au bout de quelques jours la fermentation est finie. Le mélange, laissé à l'étuve 1 ou 2 mois, est ensuite filtré. Il semblerait, aux dires de l'auteur, que la fermentation, tout en diminuant son pouvoir toxique, lui garde son pouvoir antigène et renforce son action immédiate.

Cryptotoxines

Faisant agir le palmitate de soude en solution à 0 gr. 2 % sur la toxine dysentérique, H. Vincent a constaté que la toxine ainsi modifiée n'est pas détruite ; si on la traite avec précaution par l'acide chlorhydrique, elle recouvre sa toxicité. Vincent appelle cryptotoxines les toxines ainsi atténuées. Leur injection répétée crée une certaine immunité. Il s'agit d'un complexe toxine-savon réversible et non d'une toxine stabilisée comme l'anatoxine.

Sédallian et Velluz ont montré qu'un mécanisme analogue à celui qui modifie le chimisme d'une micelle diastasique, non par absorption d'un savon, mais par la précipitation à la surface de la micelle de l'acide gras correspondant, à la condition que cet acide soit insoluble dans l'eau, semblait intervenir dans cette curieuse atténuation des toxines bactériennes par le savon.

Possédant ces données importantes sur l'atténuation de la toxine, nous allons aborder l'étude pratique et l'utilisation de cette toxine chez les animaux et chez l'homme, étude qui mettra en valeur les pouvoirs antigènes comparés de l'endotoxine et de la toxine soluble.

Vaccination des animaux

Purement expérimental au début, son seul but fut, par la suite, de produire un sérum antidysentérique utilisable en thérapeutique humaine. Nous avons vu, au début de ce chapitre, toutes les tentatives qui furent faites dans cette voie. Nous allons, au cours de cet exposé, en montrer les résultats.

ENDOTOXINE

Shiga, en 1924, a vacciné six chevaux avec une émulsion en eau salée d'une culture sur gelose de 24 h., chauffée une heure à 60°. Un centimètre cube de cette suspension contenait 2 mmgr. de microbes: Lmn était 0 cc. 5, soit 0 mmgr. 40. Il fit ses injections d'endotoxine à doses croissantes, et, sur ces six chevaux, quatre obtinrent un certain degré d'immunité. Il concluait déjà que « l'immunisation par les bacilles était de beaucoup la meilleure méthode. Avec la plus faible réaction sur les animaux, elle produit le plus haut degré d'immunité ».

Au *Laboratoire des sérums de l'Institut bactériologique de Lyon*, on utilise, pour immuniser les chevaux, des bacilles de Shiga et des bacilles de Flexner qui sont injectés par voie sous-cutanée. Ce sérum polyvalent, très actif, est livré en ampoules de 10 cc.

Citons aussi pour mémoire les travaux de Gasper et J. Nelson. Par une méthode très délicate, ils ont pu extraire des bacilles dysentériques une protéine intracellulaire (globuline) qui, injectée au lapin, donne

lieu à l'apparition d'anticorps spécifiques. Mais cette méthode ne semble pas avoir un intérêt pratique.

Il a été possible également de préparer des anatoxines totales en partant d'un produit d'autolysat de 24 heures d'une culture sur gelose de 48 heures (Pattay) ou d'une simple émulsion de bacilles dysentériques (Lurge et Rosenblatt).

TOXINE SOLUBLE

Nous ne reviendrons pas sur ce qui a été dit au cours de l'historique. Signalons cependant que Shiga, dans son rapport de 1924 à la commission d'hygiène de la Société des Nations, publie les résultats obtenus en immunisant six chevaux avec un filtrat de bouillon de trois semaines, conservé sous couche de toluène et dont la Lmn était 0 cc. 05 pour le lapin. Il n'eut que 50 % de succès sur les chevaux, contre 66 % obtenus avec l'endotoxine.

ANATOXINE

L'anatoxine semble être à l'heure actuelle l'antigène qui donne non pas absolument les meilleurs résultats, mais tout au moins le minimum d'inconvénients.

Dumas, Ramon et Saïd Bilal (1926) injectant 0 cc. 5, puis 1 cc. d'anatoxine à un lapin à huit jours d'intervalle, l'immunise contre 10 doses mortelles de Shiga ou trois à quatre doses mortelles de bouillon de 24

heures. Le sérum sanguin des chevaux vaccinés avec cette anatoxine acquiert rapidement un pouvoir antitoxique très élevé ; dilué à 1/300 il neutralise 6 doses mortelles de toxine.

Pebrie (1928), avec une anatoxine provenant d'un produit de filtration de cultures en bouillon mélangées et conservées sous couche de toluène, immunise un cheval qui produit assez rapidement un sérum actif.

A l'Institut bactériologique de Lyon, nous avons vacciné des lapins par injections intraveineuses, à 8 jours d'intervalle, de l'anatoxine dont nous avons donné précédemment la technique de préparation.

1 ^{re} injection		5 centimètres cubes		
2 ^e	—	8	—	—
3 ^e	—	15	—	—
4 ^e	—	30	—	—
5 ^e	—	50	—	—
6 ^e	—	80	—	—

Les animaux, le jour de la première injection, ont présenté de l'inappétence et un peu de prostration. Ces phénomènes ont rapidement rétrocedé, et les injections suivantes n'ont provoqué aucune réaction. A la fin du deuxième mois, nous avons pu soutirer le sérum dont nous poursuivrons l'étude dans le prochain chapitre.

Vaccination humaine

ENDOTOXINE

En 1898, Shiga essaya de vacciner ses compatriotes par injection sous-cutanée de cultures tuées. Les troubles locaux et généraux étaient trop nombreux pour que la méthode fût employée. Au cours des années qui suivirent, les bactériologistes atténuèrent les bacilles avant de les employer comme vaccin. Nous ne reviendrons pas sur un sujet précédemment traité, car guère plus heureux que leur devancier, les auteurs qui utilisèrent l'iode, l'eusol, etc., comme moyen d'atténuation, ne purent mettre au point une méthode pratique.

Cependant les corps microbiens avaient un pouvoir antigène effectif, la vaccination des animaux en était une preuve suffisante.

Une nouvelle étape se dessinait déjà. Dopter (1908) avait démontré que des souris, après avoir absorbé pendant plusieurs jours consécutifs des bacilles dysentériques tués et séchés, résistaient à des doses mortelles de bacilles virulents introduits par voie sous-cutanée ; elles s'immunisaient de façon prolongée, tandis que les témoins succombaient rapidement. Ces résultats furent confirmés par Gabritchewski et Zeithers, Schwostek, Shiga, Ch. Nicolle et Blaizot. Damade, en 1922, préconise, pour éviter l'action du suc gastrique, de faire absorber ces vaccins *per os*, soit en capsule, comme les vaccins type Lumière, soit

en vaccin-lavement, comme l'ont préconisé Courmont et Rochaix, pour le vaccin antityphique.

Besredka prépara un bilivaccin antidysentérique comparable à son bilivaccin antityphique. Mais, en 1927, Shiga démontrait l'inutilité de l'action de la bile dans la vaccination *per os*. Par contre il expérimentait un vaccin simplement chauffé à 60° : les lapins ayant ingéré dix jours de suite ce vaccin à raison de 5 mmgr. de corps microbiens par jour, supportèrent ultérieurement une dose mortelle de toxine. Ce vaccin s'est montrée à l'usage plus efficace qu'un vaccin sensibilisé, par un immun sérum, suivant la méthode de Besredka, ou qu'un vaccin incorporé dans du miel d'abeille.

Les observations et les essais sont nombreux de vaccinations buccales au cours de ces dernières années (Raynaud, Lesbre et Verdeau, Dopter et Repair, Calmette, Costa, Boyer et Van Deinse, Gautier, etc...). Les avantages de la vaccination buccale résident dans ce fait « qu'elle ne cause pas de shock à l'organisme et que, par conséquent, elle n'a pas de contre-indications. D'autre part, elle se montre active, aussi bien préventivement que curativement » (Damade).

En 1930, Russo a préparé, au Congo Belge, un vaccin assez curieux. Il a broyé une petite quantité de selles de dysentérique convalescent. Il a ensuite incorporé ce produit à du sérum physiologique en le diluant suffisamment, l'a filtré sur papier. Ce vaccin fut stérilisé par 11 gouttes d'acide phénique par 10 cc. Ce vaccin s'est montré préventif et curatif, sans aucune réaction. Peut-être n'était-ce qu'un bactériophage ?

A l'heure actuelle, on emploie un vaccin polyvalent anti-Shiga, anti-Flexner et anti-Strong, à raison de deux injections sous-cutanées de 1 cc. et 2 cc. L'immunité ne dure qu'un an. Ce vaccin n'est pas encore entré dans la pratique courante et n'a pas encore été utilisé dans les grandes collectivités, telles que l'armée.

L'ANATOXINE

La toxine soluble s'est montrée trop virulente chez l'homme pour que l'on ait pu l'utiliser comme vaccin. Par contre, Dumas, Ramon et Saïd Bilal ont contrôlé en 1926 la valeur antigénique de l'anatoxine sur l'homme.

31 élèves-officiers du « Jeanne-d'Arc » ont reçu deux injections d'anatoxine de 1/2 cc. puis 1 cc. dans le tissu sous-cellulaire de la région pectorale ; 3 ou 4 jours après la première injection, nodule douloureux à la pression, sans adénopathie axillaire. Après la deuxième injection, les douleurs ne sont pas plus vives. Pas de réactions générales. Cette vaccination est moins douloureuse que la vaccination au T. A. B. Malheureusement, ces résultats ne purent être contrôlés en milieux épidémiques ; néanmoins le sérum de ces sujets présentait une réelle propriété antitoxique.

Si extraordinaire que cela puisse paraître, il ne semble pas que, depuis 1926, on ait repris une expérimentation de ce genre. Nous n'avons pas retrouvé dans la littérature de nouveaux essais de vaccination

par l'anatoxine. Peut-être les résultats éloignés n'ont-ils pas été ce qu'attendaient d'eux leurs auteurs. De toute façon, il faut déplorer l'abandon de cette méthode qui eût pu, après une sérieuse mise au point, rendre en milieux épidémiques des services comparables à ceux que nous devons à l'anatoxine diphtérique.

Conclusion

Le bacille diphtérique s'étant rapidement montré un antigène déficient, on dut se tourner uniquement vers la toxine diphtérique. Le bacille dysentérique, au contraire, est très riche en propriétés antigènes, tant par lui-même que par sa toxine soluble.

Nous avons montré, dans une étude comparative, au cours du chapitre précédent, que l'un et l'autre produits, toxine soluble et endotoxine (corps microbiens) étaient doués d'une toxicité semblable. Comparant dans ce chapitre leur pouvoir antigène, nous constatons qu'il obéit aux mêmes lois. Kruse, Kraus et Doerr immunisaient des animaux, dès le début du siècle, avec des corps microbiens, tandis que Rosenthal vaccinait un chien avec une toxine filtrée. Par la suite, divers moyens chimiques permettaient d'atténuer, les uns l'endotoxine, les autres la toxine soluble. Pendant que Shiga préparait un sérum antidysentérique avec une émulsion de bacilles atténués par la chaleur, Dumas, avec son anatoxine, lançait un sérum de cheval d'une activité non moins remarquable.

Il n'est pas jusqu'aux tentatives de vaccination humaine menées parallèlement, sinon avec succès, du moins avec des résultats appréciables, par injection d'anatoxine et par injection ou ingestion de corps microbiens, qui ne soient intéressantes.

Une pareille corrélation peut paraître extraordinaire. Bacilles et toxine diphtérique sont très inégalement immunisants. La toxine dysentérique ne répondrait donc pas aux mêmes lois. Le pouvoir antigène pourrait-il se dissocier et se partager en parties égales entre deux toxines si différentes l'une de l'autre, si l'on admet comme différences effectives leur mode de préparation et leur aspect extérieur, l'une soluble, l'autre incluse dans le corps microbien.

La simple observation des faits tend au contraire à nous montrer *qu'il n'y a pas de dissociation de cette propriété antigène, qu'elle existe dans les deux toxines* ; par conséquent, il semble logique d'admettre, avec les auteurs modernes, l'identité vraisemblable de ces deux toxines.

CHAPITRE IV

L'Antitoxine

Chaque fois que dans un organisme quelconque pénètre un produit doué de propriétés antigéniques, en l'occurrence la toxine dysentérique, apparaît aussitôt dans le sérum sanguin de l'organisme incriminé un nouvel élément, l'antitoxine. Ce nouvel élément représente non seulement le témoin, mais aussi l'essence même de la réaction d'immunité.

Peut-être s'étonnera-t-on de voir ce mot « d'antitoxine » figurer en titre d'un chapitre dans un travail sur la toxine dysentérique. Et pourtant ce n'est qu'en constatant les réactions des deux toxines dysentériques vis-à-vis de l'antitoxine que nous pourrions mieux étudier leur nature. Ici réside, en dehors de toute considération thérapeutique, l'intérêt de l'antitoxine.

Le sérum antidysentérique peut être préparé, soit à partir d'une toxine soluble, ou plus exactement d'une antitoxine, soit à partir d'une endotoxine ; c'est le cas de la plupart des sérums livrés par les Instituts sérothérapiques.

TITRAGE DES SERUMS

Au début, on ne pouvait pas apprécier mathématiquement la valeur antitoxique de ces sérums ; d'où la nécessité devant laquelle se sont vu les auteurs de les titrer.

Kruse fut le premier, en 1902, à titrer *in vivo* un sérum, en injectant des cobayes avec une dose égale de bacilles et des doses différentes de sérum sec dissous dans de l'eau physiologique. Rosenthal agit de la même façon, tandis que Todd injecte un mélange toxine-antitoxine, placé auparavant pendant une demi-heure à 37°. Kraus (1905) injecte en premier lieu la toxine, ensuite l'antitoxine, à intervalles plus ou moins grands.

Par contre, Kolle, Heller et De Mestral préférèrent la méthode des mélanges et choisissent la souris comme animal de choix (Kolle, Besredka, Sachs et Georgien, 1918). Cependant, le lapin a toujours ses adeptes (Vaillard et Dopter, Coyne et Anchi, Pfeiffer et Ugermann, Selter). Sordelli choisit un oiseau de l'Amérique du Sud, le « mitso ».

METHODE DES MELANGES

1° Jusque-là les essais sont diffus. Aussi Fukuhara, en 1919, propose-t-il une méthode : il préconise la méthode des mélanges et demande un étalon uniforme, la toxine soluble perdant de sa valeur en vieillissant. Il choisit la dose de sérum neutralisant cent do-

ses minima mortelles et recherche la Lo et la L+ d'une toxine par rapport à l'antitoxine étalon.

Lo de la toxine : quantité maxima neutralisée entièrement par l'étalon d'antitoxine (dose neutralisée).

L+ de la toxine : dose minima de toxine qui, mélangée à l'étalon antitoxique, est régulièrement mortelle (dose limite mortelle).

Il mélange à l'unité antitoxique des doses de toxine de 0 cc. à 2 cc. 6 ; les lapins recevant les mélanges de moins de 1 cc. 01 de toxine résistent, ceux qui reçoivent 2 cc. 4 et plus, meurent :

Lo = 1 cc.

L+ = 2 cc. 4.

L+ déterminée, il cherche, par un titrage semblable sur l'animal, la plus forte dose du sérum à titrer qui, mélangée à la dose L+ de la toxine permet à celle-ci de tuer l'animal. Ainsi s'il faut ajouter 0 cc. 02 de sérum à L+ de toxine pour sauver l'animal, et 0 cc. 01 pour le tuer, 0 cc. 01 de sérum vaut une unité antitoxique et 1 cc. de sérum contiendra 100 unités. (U.A.).

Mais les variations d'auteurs à auteurs amenèrent les divers Instituts à collaborer en vue d'une standardisation des titrages. Il existait beaucoup de divergences de vues. On hésitait sur le choix des souches, des toxines étalons, des techniques. Enfin, vu la préparation des sérums à partir de toxines solubles ou d'endotoxine, on ne savait pas encore nettement s'il fallait tenir compte uniquement des propriétés antitoxiques des premiers et des propriétés antimicrobiennes des seconds.

2° La Conférence sérologique de Londres (décem-

bre 1921) invita les Instituts à échanger sérums, toxines, cultures. Les propriétés antitoxiques et antientérotoxiques devaient être vérifiées au moyen de toxines et de cultures tuées. Pour cela l'Institut de Francfort prépara un sérum, titré sur des souris par injection intraveineuse d'un mélange T.A. (toxine-antitoxine) ; son efficacité devait être étudiée sur le lapin, la souris et le cobaye.

3° La Conférence de Paris (1922) publia les résultats des recherches. Il fallait .

Des lapins de 1.500 à 1.600 gr. (Doerr) ou des souris de 15 à 20 gr. (Dopter).

Des toxines liquides, des bactéries autolysées, des toxines solides (Welcome), toxine de Vollgifte, bactéries tuées par la chaleur.

On jugeait inutile de séparer les caractères antineurotoxiques et antientérotoxiques, ni les propriétés antitoxiques et antimicrobiennes. Ce dernier fait est déjà très important à signaler.

3° Sur l'initiative du Comité d'hygiène de la Société des Nations, la Conférence de Genève se réunit en 1924. Coopérèrent à ces études les divers Instituts étrangers :

Professeurs Kolle (Francfort), Hirzfeld (Varsovie), Doerr (Bâle), Shiga (Japon), Cantacuzène (Roumanie), Dumas (Institut Pasteur de Paris), Dâle (Londres), O'Brien (Kent), Pébrie (Elstrée) et Madsen (Copenhague) et leurs collaborateurs.

Il est inutile que nous donnions les conclusions de cette conférence. Nous allons les retrouver définitivement arrêtées dans la Conférence suivante :

4° *Conférence de Genève, 1926*, rend compte des essais et conclut :

1° L'unité doit être fondée sur un sérum étalon.

2° La toxine locale doit être fixée par un sérum étalon.

3° Les sérums à évaluer sont comparés au sérum étalon en question, en vue de terminer leur puissance relative, et par suite leur teneur en unités.

Trois fois par an l'Institut de Copenhague distribue aux Instituts intéressés des échantillons de sérum étalon. — Chaque Institut doit titrer sa propre toxine d'épreuve selon la définition de l'unité, et les divers sérums commerciaux pourront être titrés au moyen de cette toxine d'épreuve.

TECHNIQUE

TITRAGE DE LA TOXINE D'EPREUVE

Déterminer la dose de toxine qui, en présence de 1/200 cc. de sérum étalon, permet d'obtenir un taux de survivance de 66 % ou plus des souris (Dosis neutralisata). On fixe ensuite la dose plus exacte qui provoque, en présence de 1/300 cc. de sérum étalon, un taux de mortalité de 66 % (Dosis non neutralisata). La dose d'épreuve est égale ou inférieure à 0,35 mmgr. pour la première, et égale ou supérieure à 0,36 mmgr. pour la seconde. (Pour la préparation de la toxine, cf. technique du Docteur Madsen, Chap. II.)

TITRAGE DU SERUM

I. Les mélanges de toxine et d'antitoxine doivent dans chaque cas être dilués de façon que le volume de chaque injection soit de 0 cc. 5.

II. Les mélanges toxine antitoxine sont soumis à une incubation d'une heure à 37°.

III. L'injection doit être intraveineuse avec la souris.

IV. Les souris doivent être d'un poids aussi uniforme que possible sans sortir des limites de 15 à 20 gr.

V. Six souris au moins doivent recevoir une injection de chaque mélange faisant l'objet des épreuves.

VI. Les souris mortes en moins de 18 heures après l'injection doivent être exclues des calculs. La proportion des survivantes est calculée par rapport au reliquat.

La technique est par conséquent fixée. Il est cependant intéressant de voir comment, au cours de l'enquête menée par la Conférence de Genève et au cours des travaux exécutés postérieurement à cette Conférence ont été interprétés les divers éléments qui entrent en jeu dans le titrage.

Nous ne reviendrons pas sur les mobiles qui ont pu pousser les auteurs au choix de la souris comme animal témoin ; nous avons suffisamment développé cette question au cours du Chapitre II.

TOXINE D'ÉPREUVE

Le choix de la toxine d'épreuve a suscité par contre plus de controverse. Cette discussion nous intéresse particulièrement ; car, si les auteurs s'accordent pour reconnaître qu'un sérum fabriqué à partir d'une toxine filtrée, d'une toxine lavée, ou de corps microbiens desséchés, peut être indifféremment titrée avec l'une ou l'autre de ces toxines — et c'est un point qui nous est acquis — il importe, au point de vue de la pratique courante, de savoir quelle toxine utiliser (Kolle, Schlossberger et Prigge, Doerr, Tarrasewitch).

ENDOTOXINE

La toxine microbienne desséchée présente une très grande stabilité. Elle peut être conservée très longtemps sans voir son activité varier d'une façon considérable. Par contre, il se fait toujours une forte agglutination, dès qu'on lui ajoute le sérum spécifique, « agglutination qui pourrait ne pas être indifférente quant aux titrages pratiqués sur la souris ». (Ionesco Mihaesti, Pebré.) Shiga a montré en effet que cette toxine microbienne est difficile à manipuler ; il est à peu près impossible d'obtenir autre chose qu'une fine suspension de molécules — et il se demandait si toutes les molécules de la toxine étaient dissoutes, ou s'il y en avait encore enfermées dans les débris bactériens, ou encore adsorbées par des molécules non spécifiques.

TOXINE SOLUBLE

La toxine soluble, si elle ne présente pas ce dernier inconvénient, s'est montrée, aux dires des auteurs, beaucoup moins stable. Elle subit un affaiblissement progressif marqué surtout pendant les premiers mois de conservation à la glacière. Ionesco-Mihaesti et Combiescu ont constaté qu'une toxine aussi conservée (sous toluène et à la glacière) dont Lmn, neuf à dix jours après la préparation, était située entre 0 cc. 1 et 0 cc. 125, voit cette dose monter à 0,02 trois mois après, reste apparemment stabilisée jusqu'au 5^e mois, puis reste à 0 cc. 025. Elle se maintient à un niveau de toxicité relativement constant pendant dix-huit mois. A ce moment l'auteur aurait pu la considérer comme définitivement stabilisée, comparable, en cela, à la toxine diphtérique soluble qui ne montre plus des variations appréciables du titre toxique après un pareil délai de conservation. Or, de nouveaux titrages montrèrent une diminution considérable, Lmn atteignant 1 cc.

Ce fait était regrettable, car l'emploi d'une toxine soluble, fraîche, augmente la régularité des titrages. Aussi Pébrie, en 1928, a-t-il essayé de mettre au point une toxine qui, à l'encontre de celles de Ionesco-Mihaesti, resterait stable. Elle consiste en un autolysat filtré de bacille dysentérique, préparé de telle façon que, par l'ajustement de la réaction, par exemple, et par l'action tampon de sels surajoutés, qui lui conserveraient longtemps ses caractères particuliers, en la

laissant dans les conditions habituelles de repos garderait une stabilité égale sinon supérieure à celle de la toxine diphtérique. La toxine n° 222 filtrée et laissée à la glacière sous couche de toluène est restée stable pendant plus d'un an. De même Zangger a pu conserver inchangées deux toxines durant un an.

Ces résultats sont assez contradictoires. Il me semble pas impossible, néanmoins, que cette toxine puisse sous certaines conditions rester stable. Mais il faudrait la contrôler de temps avec un sérum étalon, pour réaliser avec elle le titrage des sérums. La Conférence de Genève de 1926 a résolu la question, en donnant comme étalon non pas une toxine, mais un sérum. Il y a intérêt aussi dans ces titrages à employer de fortes doses de toxine et de sérum pour obtenir de meilleurs résultats (Blake et O. Kell). D'ailleurs, Shiga a montré que dans le cas du sérum antidysentérique le mélange toxine- antitoxine suivait la loi des multiple, malgré l'opinion contraire émise par d'autres auteurs (Hirzfeld).

RESULTATS DES TITRAGES

Voici quelques protocoles d'expérience montrant que l'antitoxine peut être également titrée avec une endotoxine ou une toxine soluble.

Ionesco-Mihaesti et Combiesco ont préparé deux sérums de cheval, l'un, le sérum type P avec des cultures intégrales de bacilles dysentériques, l'autre le sérum type Shiga, avec une toxine filtrée (souche Shiga).

I. Le titrage est effectué sur souris de 15 gr. par voie intraveineuse avec une toxine filtrée. Lmn : 0 cc. 1 tue les souris en 48 heures.

Sérum type Shiga :

1. 0 cc. 05 dil. 1/40 (1/800) S + 0,2 T. = + 3 jours
2. — — 1/20 (1/400) S + 0,2 T. = +
3. — — 1/10 (1/200) S + 0,2 T. = survie

Sérum type P. :

1. 0 cc. 05 dil. 1/40 (1/800) S + 0,2 T. = + 48 heures
2. — — 1/20 (1/400) S + 0,2 T. = + 48 heures
3. — — 1/10 (1/200) S + 0,2 T. = + 3 jours
4. — — 1/5 (1/100) S + 0,2 T. = survie

II. Le titrage est effectué sur souris de 15 gr. par voie intraveineuse avec une endotoxine (émulsion de corps microbiens). Lmn = 0 gr. 00005 (1/20 de mmgr.). On emploie quatre doses mortelles : 0 gr. 0002.

1. 0 gr. 0002 T. + 0 cc. 05 dil. 1/40 (1/800) S = + 3 j.
2. 0 gr. 0002 T. + — — 1/20 (1/400) S = + 4 j.
3. 0 gr. 0002 T. + — — 1/10 (1/200) S = survie

En somme une même toxine soluble peut servir à titrer deux sérums fabriqués l'un avec une toxine soluble, l'autre avec une endotoxine. Enfin il est possible de titrer un sérum avec des corps microbiens.

1/200 cc. de sérum contient donc, en moyenne, la dose neutralisante pour la souris. Ceci correspond aux doses du sérum étalon de Copenhague dont on considère la dilution à 1/200 comme unité antitoxique, c'est-à-dire contenant 200 unités antitoxiques par centimètre cube.

Shiga a titré avec des corps microbiens un sérum antidysentérique, préparé par injection au cheval, de toxine filtrée. La Lmn de l'endotoxine était de 0,2 mmgr. pour la souris de 10 grammes.

1. Souris de 10 gr.	0,02 S	+ 0 mmgr.	4 T.	= survie
2. — —	0,01 S	+	—	= —
3. — —	0,005 S	+	—	= + 36 h.
4. — —	0,0025 S	+	—	= + 36 h.

TITRAGES EFFECTUES A L'INSTITUT BACTERIOLOGIQUE

Au cours des deux années pendant lesquelles nous avons travaillé à l'Institut Bactériologique de Lyon nous avons effectué plusieurs titrages. Nos essais ont porté sur trois sérums :

1° Un sérum thérapeutique antimicrobien préparé à l'Institut bactériologique, par injection de bacilles de Shiga au cheval « Valère ».

2° Un sérum expérimental préparé par nous-même, par injection d'anatoxine dysentérique à deux lapins A et B.

3° Le sérum étalon de l'Institut de Copenhague. Ce sérum étalon est un sérum sec, obtenu par injections de bacilles de Shiga chez le cheval. Il est délivré en tubes scellés, dissous dans de la glycérine : il contient 200 unités antitoxiques par centimètre cube.

Nous avons employé comme toxines d'épreuve deux toxines.

1° Une toxine soluble, filtrée après trois semaines de végétation, et qui, malheureusement, s'est mon-

trée très peu toxique. Sur la souris sa *dose minima mortelle* (Lmn) était de 1 cc. en 48 heures.

2° Une endotoxine, obtenue par centrifugation d'une émulsion en eau physiologique de corps microbiens vivants. Les poids de microbes que nous donnons ne correspondent pas aux poids de la toxine sèche du Docteur Madsen, mais il faut tenir compte de ce fait que nous n'avons pas desséché notre endotoxine, et qu'elle contient encore 80 % d'eau.

Elle tuait la souris en 48 heures à la dose de 15 milligrammes.

Nous avons effectué tous nos titrages sur souris blanches de 15 à 20 grammes, et nous avons utilisé quatre doses mortelles de toxine.

PREMIERE SERIE DE TITRAGES SUR LA SOURIS

A. SERUM ETALON (antimicrobien)

a) *Titration du sérum par l'endotoxine* (4 Lmn = 60 milligrammes).

1.	1/800 cc. de sérum	+	60 mmgr. d'endotoxine	=	+	48 h.
2.	1/400 cc.	—	+ 60 —	—	=	+ 48 h.
3.	1/200 cc.	—	+ 60 —	—	=	+ 48 h.
4.	1/100 cc.	—	+ 60 —	—	=	+ 48 h.

b) *Titration du sérum par la toxine soluble* (4 Lmn = 4 centimètres cubes).

1.	1/800 cc. de sérum	+	4 cc. de toxine	=	+	24 h.
2.	1/400 cc.	—	+ 4 cc. —	=	+	24 h.
3.	1/200 cc.	—	+ 4 cc. —	=	+	24 h.
4.	1/100 cc.	—	+ 4 cc. —	=	+	24 h.

B. SERUM DU CHEVAL « VALERE » (antimicrobien)

1.	1/800 cc. de sérum	+	60 mmgr. d'endotoxine	—	+	24 h.
2.	1/400 cc.	—	+	60 —	—	= + 48 h.
3.	1/200 cc.	—	+	60 —	—	= + 48 h.
4.	1/100 cc.	—	+	60 —	—	= + 48 h.
5.	1/50 cc.	—	+	60 —	—	= survie
6.	1/25 cc.	—	+	60 —	—	= survie

C. SERUM DE LAPIN (Antitoxique)

a) *Lapin A.*

1.	1/100 cc. de sérum	+	60 mmgr. d'endotoxine	=	+	48 h.
2.	1/40 cc.	—	+	60 —	—	= + 48 h.
3.	1/20 cc.	—	+	60 —	—	= + 48 h.
4.	1/10 cc.	—	+	60 —	—	= survie

b) *Lapin B.*

1.	1/100 cc. de sérum	+	60 mmgr. d'endotoxine	=	+	48 h.
2.	1/40 cc.	—	+	60 —	—	= + 48 h.
3.	1/20 cc.	—	+	60 —	—	= + 48 h.
4.	1/10 cc.	—	+	60 —	—	= survie

Dans cette série de titrage nous n'avions pas de point de comparaison avec le sérum étalon qui n'avait pu neutraliser les toxines soit que nos doses de toxines fussent trop élevées, soit que les quantités de sérums fussent trop faibles.

Néanmoins nous pouvions conclure que le sérum de l'Institut bactériologique avait une certaine valeur puisque au 1/50 de centimètre cube il neutralisait quatre doses mortelles. *Et nous constatons qu'un sérum préparé à partir de l'anatoxine neutralisait les corps microbiens.*

Nous avons refait une nouvelle série de titrages du sérum étalon et du sérum de « Valère » avec la même toxine soluble et avec une endotoxine dont la dose minima mortelle était de 2 milligrammes en trois jours. Les doses d'épreuve furent de deux doses mortelle pour la toxine soluble et de quatre doses pour les corps microbiens.

DEUXIEME SERIE DE TITRAGES

A. SERUM ETALON DE COPENHAGUE

(4 Lmn d'endotoxine = 8 milligrammes.)

1.	1/200 cc. de sérum	+	8 mmgr. d'endotoxine	=	+ 36 h.
2.	1/100 cc.	—	+ 8 —	—	= + 34 h.
3.	1/50 cc.	—	+ 8 —	—	= survie
3.	1/8 cc.	—	+ 8 —	—	= + 36 h.
4.	1/4 cc.	—	+ 8 —	—	= + 36 h.
5.	1/2 cc.	—	+ 8 —	—	= + 36 h.
6.	1 cc.	—	+ 8 —	—	= + 36 h.
7.	2 cc.	—	+ 8 —	—	= + 36 h.
8.	4 cc.	—	+ 8 —	—	= + 36 h.

B. SERUM DE « VALERE »

a) *Titration par l'endotoxine* (4 Lmn = 8 mmgr.).

1.	1/200 cc. de sérum	+	8 mmgr. d'endotoxine	=	+ 36 h.
2.	1/100 cc.	—	+ 8 —	—	= + 36 h.
3.	1/50 cc.	—	+ 8 —	—	= + 36 h.
4.	1/25 cc.	—	+ 8 —	—	= survie
5.	1/10 cc.	—	+ 8 —	—	= survie
6.	2/10 cc.	—	+ 8 —	—	= + 36 h.
7.	4/10 cc.	—	+ 8 —	—	= + 36 h.

b) *Titration avec la toxine soluble* (2 Lmn = 2 cc.).

1.	1/50 cc.	de sérum	+	2 cc.	de toxine	=	+ 48 h.
2.	1/25 cc.	—	+	2 cc.	—	=	survie
3.	1/10 cc.	—	+	2 cc.	—	=	+ 36 h.

Cette deuxième série de titrages n'est évidemment pas très satisfaisante. On constate de nombreuses irrégularités. Néanmoins nous pouvons retenir la dose de 1/50 cc. de sérum étalon qui neutralise 4 doses mortelles, et les doses de 1/25 cc. et de 1/50 cc., de ce titrage et du précédent, de notre sérum thérapeutique. Ce qui lui donnerait par rapport au sérum étalon *une valeur de 100 unités antitoxiques par centimètre cube*.

Mais il ne faut pas s'exagérer la valeur thérapeutique du sérum antidysentérique, car si, aux doses de 1/50, 1/25 et 1/10 cc. il a neutralisé la toxine, il s'est montré inactif à des doses plus fortes : 2/10 et 4/10 cc.

Réalisant une expérience inverse de celle que nous avons effectuée au cours du titrage précédent, nous constatons qu'à la dose de 1/25 cc. *un sérum antimicrobien peut neutraliser deux doses mortelles de toxine soluble*. Cette dernière conclusion concorde parfaitement avec celles des auteurs cités précédemment. L'inter-réaction des sérums antidysentériques et des toxines dysentériques est démontrée.

Nous émettons un doute sur la valeur des souris comme animaux témoins pour le titrage du sérum antidysentérique : Elles n'ont jamais donné entière satisfaction aux auteurs ; jamais les titrages de sérums antidysentérique n'ont eu la rigueur des titrages de sérum diphtérique sur le cobaye.

Etalonnage du Sérum par la méthode de floculation

Si l'on mélange dans des proportions convenables une toxine et un sérum correspondant, on provoque dans ce milieu une floculation. Ramon a démontré qu'elle était due à l'inter-réaction de l'élément toxine et de l'élément antitoxine à l'exclusion de tous les autres anticorps du sérum. Cependant dans un mélange de filtrat de culture en bouillon de Shiga, et de sérum antidysentérique on peut observer plusieurs zones de floculation, chacune ayant des limites beaucoup moins restreintes que la zone unique de floculation dans les mélanges de toxine et de sérum antidiphtériques qui ont été les premiers étudiés.

Il existe, en effet, dans la toxine dysentérique, à l'exclusion de la toxine diphtérique des produits de désintégration microbienne très nombreux et très variés, car les cultures s'autolysent facilement. Chacun de ces filtrats contient une multitude de substances capables de jouer le rôle d'antigènes (mosaïque d'antigènes de Nicolle et Mlle Raphael). Ils constituent en les injectant une mosaïque d'anticorps qui s'opposent à eux. Ils provoquent, *in vitro*, en réagissant entre eux des réactions plus ou moins nombreuses qui peuvent rester distinctes (zone différente de floculation), se gêner ou se renforcer mutuellement.

Néanmoins, malgré ces difficultés, Dopter et Sac-

quépée, avaient fait prévoir au Congrès de Genève la possibilité d'un titrage *in vitro* par cette méthode.

Arlindo de Assis, publie ses essais, en 1925. Il constate que la toxine dysentérique, même formolée floccule en présence du seul sérum dysentérique, lequel ne floccule pas en présence de toxines hétérogènes. Mais les irrégularités entrevues au cours de ses expériences l'empêche de baser un titrage sur cette méthode.

Patay, en 1926, reprend la méthode et constate que la réaction marche toujours avec une toxine filtrée, que la composition du milieu n'a aucune influence, que la flocculation se produit en 1 heure au bain-marie à 45°. Il démontre que les irrégularités signalées par Arlindo de Assis sont dues au manque de proportion convenable du mélange. Plus la toxine est forte, plus il faut de sérum pour la flocculer. La flocculation respecte la loi des multiples :

cc. de sérum

5 cc.	de filtrat de bouillon peptoné	flocul.	en prés.	de 0,1
10 cc.	—	—	—	de 0,2
20 cc.	—	—	—	de 0,4

Mais Patay a pu, de la même façon *flocculer des toxines autolysées et des toxines microbiennes sèches*.

Il a ainsi établi une technique d'étalonnage des sérums.

1° Déterminer la dose d'un sérum étalon qui en présence d'une quantité donnée d'une toxine choisie donne lieu à la flocculation la plus rapide.

2° Déterminer, de la même façon, la dose de sé-

rum à examiner qui, avec cette même toxine, provoque le même phénomène.

3° La quantité d'unités antitoxiques dans 1 cc. de sérum à titrer est donnée par la formule

$$X = \frac{U \times a}{b}$$

U = quantité d'unités antitoxiques dans 1 cc. de sérum étalon ;

a = dose de sérum étalon qui provoque la floculation.

b = dose du sérum à examiner, donnant lieu au même phénomène.

Cette méthode n'a cependant pas un gros retentissement. Patay signale lui-même des causes d'erreurs : floculation retardée dont il faut se méfier.

CHAPITRE V

Nature de la Toxine dysentérique

Unicité ou pluralité de la Toxine dysentérique

Au cours des précédents chapitres, notre but a été de comparer les propriétés réciproques de la toxine soluble et de l'endotoxine. Dans un premier paragraphe nous allons revoir rapidement ces données.

IDENTITE DE L'ENDOTOXINE ET DE L'EXOTOXINE

Elles diffèrent par leur mode de préparation. Dans l'exotoxiné, nous avons un produit toxique soluble, filtrable, n'acquérant sa toxicité optima qu'après une période d'une quinzaine de jours.

L'endotoxine proprement dite provient des corps microbiens. Ces organismes contiendraient, inclus en eux, une toxine, soi-disant insoluble, puisqu'elle ne traverse pas le filtre. En effet, dans une culture, les corps microbiens isolés par centrifugation déterminent des accidents chez l'animal, et le liquide décanté, puis filtré, renferme lui aussi un principe toxique. De ce fait, les auteurs pouvaient conclure à la présence, dans les corps microbiens restés dans le bouillon, d'une endotoxine insoluble, absolument différente de la toxine soluble. Mais peut-être ce second point était-il erroné.

Car ces deux toxines, qu'elles soient dissoutes ou inhérentes au protoplasma microbien ont les mêmes effets pathogènes et répondent à la même endotoxine.

La toxicité envers le lapin et la souris, variable suivant les voies d'introduction, hypodermique, intra-péritonéale ou intraveineuse se retrouve parallèle avec l'une et l'autre toxine. Les causes qui influencent la variabilité des doses d'activité de la toxine soluble, influence du milieu (peptone, PH, aérobiose), influence de la souche microbienne, agissent également sur l'activité de l'endotoxine.

Que l'on emploie des doses croissantes de toxine ou de corps microbiens, que l'on atténue ces produits par des moyens chimiques ou par le formol et par la chaleur, le pouvoir antigène existe, plus ou moins actif, mais toujours décelable. Si l'identité de toxicité n'est pas une preuve, mais un simple argument en faveur de l'identité des toxines, nous avons dans l'étude du pouvoir antigène un appoint énorme à cette

théorie. H. Vincent a démontré que le colibacille produisait une exotoxine neurotrope et une endotoxine entérotrope. Il l'a démontré non seulement en séparant les deux toxines par la chaleur, mais aussi en immunisant des lapins, et il a pu prouver par des titrages que l'exotoxine n'était pas neutralisée par un sérum produit à partir de corps microbiens et réciproquement. Il n'en est pas de même pour la toxine dysentérique : nous avons insisté sur les expériences faites par les auteurs, en particulier par Shiga et par Ionesco-Mihaesti, expériences décisives, que nous avons contrôlées par nous-mêmes.

Il est possible de neutraliser une toxine soluble par un sérum antimicrobien, comme il est possible de neutraliser une endotoxine par un sérum antitoxique que l'on emploie in vivo la méthode des mélanges toxine-antitoxine, ou in vitro la méthode de floculation. Pour que l'une de ces toxines se comporte en antigène, capable de produire une antitoxine qui neutralisera parfaitement l'autre toxine, il faut bien admettre que *ce pouvoir antigène est le même*, qu'il est supporté par des éléments très rapprochés les uns des autres.

De là à admettre l'unicité de la toxine soluble et de l'endotoxine, il n'y aurait qu'un pas, que d'ailleurs nous n'allons pas encore franchir, car sur le terrain de la biologie, plus que sur tout autre terrain scientifique, il faut rester dans le domaine de l'hypothèse, tant qu'une explication définitive ne nous en a pas été donnée.

NEUROTROPISME ET ENTEROTROPISME

Au début, on croyait que chacune de ces deux toxines avait une action élective sur l'organisme animal. L'exotoxine, provenant de filtrat de bouillon, c'est-à-dire la toxine soluble, était neurotrope ; elle ne produisait chez le lapin que des paralysies du train postérieur, sans signes intestinaux. L'endotoxine résultant des corps microbiens pulvérisés était entérotrope. Ici se glisse une petite discussion. Dans le cadre de l'endotoxine, de nombreux bactériologistes ont placé la toxine venant de produits d'autolysats filtrés. Par son mode de préparation cette toxine, faite de produits solubles que l'on filtre sur bougie, tend plutôt à se rapprocher de la toxine soluble. Mais en réalité cette toxine sert de transition entre l'exotoxine et l'endotoxine proprement dite.

Quoiqu'il en soit, en 1906, Doerr admettait l'hypothèse de ces deux toxines neurotrope et entérotrope. Il allait jusqu'à dire que l'élément neurotrope était très sensible à l'action de la chaleur, et l'élément entérotrope plus résistant. En 1908, Pfeiffer, Selter, Thytta et Falsen, Sundt, Kanai (1921) et surtout Olitsky et Kligler se sont fait les champions de cette théorie.

Par contre Vaillard et Dopter en 1903, Neisser, Shiga, Besredka, Klein, Pfeiffer et Ungermann, Ellinger et Adler, Kirschbaum, Dumas, Combiesco, Zangger, Hirzfeld, Schlossberger et Prigge, Kolle lui-même en 1921, Patay en 1926, et plus récemment Pébrie et Hosoya ont démontré qu'il y avait toujours identité

dans les lésions produites sur l'animal par ces deux toxines, et certains émettaient déjà l'hypothèse de l'identité des toxines (Dopter et Sacquépée).

Le filtrat d'une culture en bouillon détermine souvent chez le lapin une prédominance de signes nerveux. Ce fait explique bien l'erreur des dualistes ; mais toujours à l'autopsie on trouve un œdème marqué du cœcum ; on retrouve les mêmes doubles lésions après l'injection d'une culture de 22 jours conservée sous toluène et chauffée une heure à 80°, soi-disant pour détruire l'exotoxine. D'autre part, *un sérum antimicrobien immunise contre l'injection de toxine soluble et réciproquement* (Perry et Coppinger, Klein) ; ceci est des plus démonstratifs, car l'on sait que le sérum anticolibacillaire de Vincent, s'il est antitoxique ne protège que contre l'exotoxine, et s'il est antimicrobien contre la seule endotoxine (*Thèse de Frezouls, 1931*) ; et, pour l'instant, on admet que l'exotoxine et l'endotoxine sont deux choses bien distinctes (Vincent).

Ionesco-Mihaesti et Combiesco, en 1928, ont injecté, dans la veine du lapin, une toxine chauffée deux heures à 60°. La toxine n'acquiert pas, par ce chauffage, d'élection pour le système nerveux ou pour l'intestin, contrairement à Olitsky et Kligler qui admettent deux composants toxiques dissociables par la chaleur.

Pas plus que par la chaleur, il n'est possible de séparer ces deux éléments par les méthodes d'ultrafiltration (Ionesco-Mihaesti, Przesmycki), ni par précipitation (Hosoya et Stéphanopoulo).

Purification

de la Toxine dysentérique

Afin de mieux étudier la constitution de la toxine, il fallait la débarrasser des albumines, cristalloïdes, ou corps organiques divers que le filtre ne pouvait éliminer n'ayant pas la ressource d'utiliser, comme le firent Guinochet, Gamaléia, Ouchinsky pour le bacille diphtérique, J. Courmont et A. Morel pour d'autres bactéries, des milieux synthétiques chimiquement définis, les auteurs durent se rabattre sur les procédés d'ultrafiltration et de précipitation par les agents chimiques. C'est en vain que Ludke essaya un milieu sans albumines ni peptones : aucune végétation ne s'y produisit.

ESSAIS D'ULTRAFILTRATION

C'est en 1914 que Kirschbaum sépare le poison du bouillon dysentérique et le décompose en éléments séparés à l'aide d'un ultra-filtre modifié d'après les données de S. Frankel et Elfer. Le bouillon est comprimé dans le vide à basse température, et libéré des corps microbiens par aspiration sur amiante. Le liquide ainsi obtenu est filtré à travers un filtre à collodion acétique glacial à 4 1/2 % sous une pression de 6 atmosphères. La toxine retenue dans le filtre est soluble dans les solutions étendues de carbonates alcalins et insoluble dans les acides étendus. Sous

l'action des acides, la toxicité disparaît, mais le pouvoir antigène persiste. L'action est réversible, car la dissolution de la toxine acidifiée lui rend son pouvoir toxique. Du point de vue chimique, la réaction du Biuret est faible mais certaine. La présence de tryptophane et de tyrosine est constatée ; on ne trouve ni hydrocarbonés, ni noyaux puriques ; les nucléo-protéides, décelables par la présence de phosphore proviendraient, de l'avis même de l'auteur, non pas de la toxine, mais de la solution mère.

Un litre de bouillon donne 0 gr. 30 de toxine. Le filtrat est complètement atoxique et dépourvu de pouvoir antigène. Il nous paraît assez bizarre que Kirschbaum ait attribué la provenance de ces nucléo-protéides au bouillon ; il semblerait plus logique de penser qu'elles viennent de la toxine. La réaction du Biuret indique la présence de peptone.

Przesmycki, Lipowska et Siébakowski en 1929, partant d'un filtrat d'un bouillon (Ph 7,5) de quatorze jours, effectuent l'ultrafiltration sur filtre au collodion de 1 % à 10 % suivant la méthode de Bechhod Konig. Voici les résultats :

1.	Toxine avant filtration		Lmn 0 cc. 075
2.	Toxine filtrée. Collodion 1 %		Lmn 0 cc. 1
3.	— — — 2 %		Lmn 0 cc. 1
4.	— — — 4 %		Lmn 0 cc. 15
5.	— — — 10 %		survie

Les filtres au collodion à 1 et 2 % retiennent 25 % de toxine ; les filtres à 4 % 50 % ; les filtres à 10 % la retiennent toute.

ESSAIS DE PRECIPITATION

Ces procédés utilisent la précipitation par les agents chimiques.

Neisser et Shiga, Rosenthal et Todd se servaient, d'une part, d'un mélange d'alcool-éther ; d'autre part, du sulfate d'ammoniaque et des sels de métaux lourds. Didonna lave des bactéries avec des alcalins, extrait un produit qu'il peut précipiter par l'addition prudente d'acide acétique : le dosage révèle des nucléoprotéides dont Kirschbaum contestera plus tard l'existence.

Hosoya et Stephanopoulo (1929) ont pu obtenir une toxine purifiée soi-disant abiurétique et à réaction de Millon négative, exigeant une antitoxine riche pour la neutraliser. Cette méthode demande une série de manipulations complexes : précipitation par l'acétate de zinc, dissolution dans le citrate et le sulfure d'ammoniaque et dialyse. Or nous savons que la dialyse modifie considérablement les propriétés de la toxine diphtérique (MM. Leulier, Sédallian et Mme Clavel), et il nous est permis de penser que des phénomènes analogues peuvent se produire dans le cas de la toxine dysentérique, et compromettre, de ce fait, les résultats de l'expérience.

Cette année, Hansen filtre sur papier un bouillon peptoné de trois semaines. La Lmn pour le lapin est de 0 cc. 015. Il fait absorber 2 l. 5 de toxine par 500 cc. de suspension d'hydrate d'aluminium. Le dépôt est trituré au mortier avec du phosphate de soude et

étendu d'eau. La Lmn de cette solution est de 0 cc. 015. Au dosage : Azote total 1,62 mmgr., Azote aminé 0,15 mmgr., pour 5,48 mmgr. et 1,35 mmgr. dans la toxine brute. Le rendement est très imparfait. Une partie est mise à l'étuve à 22°, formolée à 5 %. 0 gr. 50 de cette anatoxine immunise le lapin contre 0 gr. 15 de toxine. Des essais similaires ont été effectués sur une toxine desséchée et sur des bacilles frais. L'auteur conclut que dans le produit définitif, la presque totalité de l'azote se trouve sous la forme aminée.

D'une façon générale, les résultats sont imparfaits et aboutissent à des échecs. D'une part on obtient une toxine purifiée qui semble dépourvue d'albumines et absence de peptone (réactions de Biuret et de Millon négatives) voire même de nucléo-protéides (Kirschbaum), d'autre part on retrouve dans d'autres toxines ces derniers produits, et de l'azote, témoin de la présence d'albumines. Les premiers résultats tendraient à nous faire penser à l'existence d'une toxine sans supports albuminoïdes. Cela nous paraît bien improbable.

Essai de Précipitation au Ph. 4,7.

Pour fragmenter les sérums et rechercher dans quelle fraction des albumines précipitées se trouve le principe antitoxique, MM. Sédallian et Loïseleur les avaient précipités par abaissement Ph 4, 7. MM. Sédallian, Leulier, Mlle Gaumond et Mme Clavel ont appliqué ce même principe à la toxine diphtéri-

que. Nous allons en faire un court exposé qui nous permettra de faire une étude comparative avec la toxine dysentérique.

PRECIPITATION DE LA TOXINE DIPHTERIQUE

Ces auteurs ont pu isoler la fraction active d'une toxine diphtérique en abaissant son P_H à 4,7 par un acide quelconque (HCl ou CH^3COOH) et en recueillant le précipité obtenu par centrifugation.

Le liquide surnageant est atoxique et dépourvu de pouvoir antigène. Le flocculat, au contraire, est toxique lorsqu'il est dissous en eau ou en bouillon Martin. Il n'a de propriétés antigènes que lorsqu'il est repris en bouillon Martin ou en eau peptonée. « Le bouillon apporte un élément de stabilité à la toxine, cet élément est vraisemblablement constitué par les substances peptonées qui jouent pour elles le rôle de colloïdes protecteurs. » (Mme Clavel).

D'ailleurs cette toxine précipitée donne la réaction du Biuret due à des peptones entraînées et indispensables. D'autre part elle est constituée essentiellement par des nucléo-protéides.

Les auteurs ont constaté que le poids des bacilles est proportionnel au poids du flocculat obtenu par précipitation de la toxine aux différents temps de la croissance du 1^{er} au 7^e jour. *Ils en concluent que l'apparition de la toxine est liée à la formation de nucléo-protéides, provenant eux-mêmes de la lyse des corps microbiens.* L'alcalinité du milieu favorise cette lyse et la dissolution des nucléo-protéides.

« Ce nucléo-protéide actif et toxigène, qui représente la toxine, doit une partie de ses propriétés nocives aux ions qui lui sont accolés, et qui donnent sans doute au système colloïdal qui les supporte la marque de leur spécificité... Obtenue sous sa forme habituelle de toxine totale, la substance diphtérique est composée de l'engrenage des nucléo-protéides toxiques et des colloïdes stabilisateurs non spécifiques. » (Mme Clavel.)

PRECIPITATION DE LA TOXINE DYSENTERIQUE AU PH 4,7

Ces auteurs avaient déjà tenté de précipiter la toxine dysentérique de la même façon. Sur les conseils de M. Sédallian nous avons repris ces essais. Nous avons préparé une toxine peptonée (peptone Chapoteaut: 2, 5 %), alcalinisée au Ph 7,5, très aérée. Nos souches provenaient, deux de l'Institut bactériologique de Lyon, la troisième de l'Hôpital Militaire du Val-de-Grâce.

A cette toxine, nous avons ajouté de l'acide acétique en quantité suffisante pour l'abaisser au Ph 4,7. On voit apparaître, au bout de quelques temps de rares grumeaux, qui, en une douzaine d'heures se déposent au fond de l'éprouvette. Ce produit est centrifugé à grande vitesse, et l'on obtient ainsi un précipité grisâtre et un liquide surnageant que l'on sépare complètement l'un de l'autre.

Auparavant nous avons effectué des titrages de

ces bouillons et de ces toxines solubles (Cf. Chapitre II - Activité toxique).

Voici le protocole de notre expérimentation :

I. — *Recherche de la toxicité*

a) 3 Juillet 1929.

Titrage de la toxine soluble de 24 jours sur le lapin par injection intraveineuse.

0 cc. 15 = + en 24 heures

6 Juillet 1929

Précipitation de la toxine. Recherche de la toxicité.

Toxine totale	0 cc. 15	= + en 24 h.
Liquide surnageant	0 cc. 15	= + en 24 h.
Flocul. dissous en bouillon Martin.	0 cc. 15	= survie
Floculat dissous en eau distillée.	0 cc. 15	= survie

b) 16 Octobre 1929.

Précipitation d'une toxine de 15 jours. Recherche de la toxicité.

1° Liquide surnageant neutralisé :

0 cc. 5	Lapin n° 4	= + 48 h.
1 cc.	Lapin n° 5	= survie

2° Floculat neutralisé redissous au volume primitif.

0 cc. 5	Lapin n° 6	= survie
1 cc.	Lapin n° 7	= survie

Dans l'un et l'autre cas seul le liquide surnageant se montre toxique. Le pouvoir toxique n'a pas précipité avec le floculat.

II. — Recherche du pouvoir antigène.

Les lapins ont été vaccinés avec une toxine, le liquide surnageant et le flocculat formolés, puis éprouvés avec une toxine dont 0 cc. 1 tue le lapin en 48 heures.

Première série :

13 Août 22 Sept. 10 Oct.

Tox. d'épreuve

A.92 flocculat formolé	0 cc. 5	4 cc.	2 cc.	meurt en 4 j.
A.93 Liqu. surnageant	0 cc. 3	4 cc.	2 cc.	survit
A.94 Toxine formolée	0 cc. 3	4 cc.	2 cc.	meurt en 8 j.

Deuxième série :

19 Oct. 29 Oct. 15 Nov.

Tox. d'épreuve

B.21 Flocculat formolé	2 cc.	4 cc.	2 cc.	meurt en 4 j.
B.22 Liqu. surnageant	2 cc.	4 cc.	2 cc.	survit
B.23 Toxine totale	2 cc.	4 cc.	2 cc.	survit

Troisième série :

23 Oct. 31 Nov. 16 Déc.

Tox. d'épreuve

B.25 Flocculat formolé	2 cc.	4 cc.	2 cc.	meurt en 8 j.
B.24 Liqu. surnageant	2 cc.	4 cc.	2 cc.	survit
B.26 Toxine totale	2 cc.	4 cc.	2 cc.	survit

De ces expériences, dont une partie a été faite par Monsieur le Médecin-Commandant Le Bourdellès, au Laboratoire de Bactériologie et de sérologie de l'Ecole du Service de Santé Militaire de Lyon, on devait conclure que la partie précipitée ne contenait pas la toxine dysentérique. Elle ne supporte pas, en effet, le

pouvoir toxique puisque les lapins ne succombent pas après l'injection. Elle ne contient pas non plus les propriétés antigènes, car, si, dissous en bouillon et formolisé, on l'injecte au lapin, celui-ci ne supporte pas l'injection de la toxine d'épreuve.

À contraire ces deux propriétés restent intactes dans le liquide surnageant, et superposables à celles de la toxine non précipitée. Il ressort donc que la toxine est restée entière dans le liquide surnageant, et que nous ne pouvons pas par abaissement au pH 4,7 le précipiter comme la toxine diphtérique.

Essai sur la formation et sur la constitution de la Toxine dysentérique

De leurs expériences, MM. Leulier, Sédaillan, Mlle Gaumond et Mme Clavel avaient conclu à l'identité chimique entre la toxine diphtérique soluble et les corps microbiens diphtériques, l'un et l'autre contenant des nucléo-protéides. L'un et l'autre ont pour le cuivre une affinité telle que les dosages montrent un parallélisme constant entre le cuivre microbien et celui renfermé dans la toxine précipitée à pH 4,7.

Se basant sur ces faits, ils pensaient que la toxine diphtérique soluble, type des exotoxines, était, non un produit de sécrétion des bacilles de Loeffler, mais *un produit de lyse microbienne*.

Une question analogue se posait pour la toxine dysentérique. Il existe, en effet, une certaine analogie entre la production de ces deux toxines : pour obtenir une toxine dysentérique active, le bouillon doit faire à l'étuve un séjour assez long (une vingtaine de jours), au cours duquel les corps microbiens peuvent se lyser, la végétation s'arrêtant le dixième jour. Ce bouillon exige une alcalinité : or, dans le cas de la toxine diphtérique cette alcalinité semble favoriser la lyse microbienne.

Mais nous venons de voir qu'il est *impossible* de précipiter la toxine dysentérique à $\text{pH } 4,7$ et par conséquent de faire un titrage comparatif entre les corps microbiens et la toxine soluble. Cette exotoxine paraît beaucoup plus divisée dans le bouillon qui la supporte que la toxine diphtérique ; ou tout au moins elle est supportée par des colloïdes dont le point isoélectrique est probablement différent de celui de la toxine diphtérique.

C'est sur un autre terrain qu'il faut chercher des explications sur la nature de la toxine dysentérique.

Or, nous avons vu :

1° L'identité entre l'exotoxine et l'endotoxine dysentériques au point de vue pathogène.

2° L'identité de leurs caractères antigènes.

3° L'identité des réactions de titrage.

Ces arguments nous paraissent tels que l'on puisse considérer *la toxine dysentérique comme, elle aussi, un produit de lyse microbienne*. Cette conception concorde avec celle de nombreux auteurs (Dopter, Sacquépée, etc...).

Nous restons cependant dans le domaine de l'hypothèse, ainsi que MM. Leulier, Sédallian, Mlle Gaumont et Mme Clavel y sont restés pour la toxine diphtérique, mais tout se passe comme si les toxines microbiennes, la toxine dysentérique en particulier n'étaient que des produits de lyse bactérienne. Cette lyse s'arrête plus ou moins loin dans le processus de dégradation et peut donner dans le bouillon des solutions ou pseudo-solutions de toxines de différentes constitutions : précipitables à PH 4,7 comme la toxine diphtérique ; non précipitables à PH 4,7 comme la toxine dysentérique.

Conclusions

I. — Nous avons eu, pour but d'étudier la toxine dysentérique, et de grouper dans une revue générale, les travaux qu'elle a suscités. Nous avons, nous-mêmes, cherché à étudier cette toxine, et à mettre au point les procédés de titrage de l'antitoxine préconisé par la Commission d'Hygiène de la Société des Nations, chargée en 1926 de la Standardisation des sérums.

II. — On doit comprendre sous le nom de toxine dysentérique : d'une part, l'endotoxine incluse dans les corps microbiens du bacille de Shiga, et d'autre part la toxine que l'on retrouve dans les filtrats du bouillon, dans lequel ce microbe a été cultivé : c'est l'exotoxine dysentérique.

III. — Les deux toxines sont de même nature, leur présence dans les cultures totales dépend des mêmes

conditions : (bouillon, peptone, aérobiose, PH, etc...). Elles provoquent chez l'animal les mêmes lésions et il n'y a pas lieu de distinguer une endotoxine entéro-trope et une exotoxine neurotrope, l'un et l'autre produits manifestant des activités et des affinités parallèles.

IV. — De même, elles renferment un antigène commun et identique. Les sérums préparés avec l'endotoxine neutralisent l'exotoxine et réciproquement.

V. — C'est sur cette propriété, d'ailleurs, qu'est basée la méthode de titrage préconisée par la Commission d'Hygiène de la Société des Nations ; dans cette méthode la toxine d'épreuve servant au titrage du sérum est une poudre microbienne desséchée.

VI. — Mais cette méthode, si elle est, sans aucun doute, la meilleure que nous possédions pour titrer l'antitoxine dysentérique, n'est pas encore parfaite. Son application sur la souris blanche entraîne des causes d'erreurs dont la moindre est la variabilité de réceptivité de cet animal à la toxine dysentérique et par conséquent aux mélanges toxine-antitoxine du titrage.

VII. — La toxine dysentérique ne précipite pas au PH 4,7. Dans le bouillon ainsi amené à l'acidité, le pouvoir toxique n'existe que dans les éléments restés stables. Il n'est donc pas possible de faire une analyse comparative des corps microbiens et de l'exo-

toxine isolée, comme cela a pu être fait par MM. Leulier, Sédallian et Mme Clavel avec la toxine diphtérique.

Mais les arguments biologiques plaident en faveur de l'hypothèse qui fait de la toxine dysentérique une pure et simple endotoxine dissoute ou répartie dans les milieux de culture.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
P. COURMONT.

Vu :
LE DOYEN,
Jean LEPINE.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 3 Novembre 1931.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. LIRONDELLE.

Bibliographie

- ANTONOVSKI. — Essai de vaccination antidysentérique *per os*. (*C. R. Soc. Biol.*, 1924.)
- ARLINDO DE ASSIS. — De l'action du formol sur la toxine dysentérique. Sur la floculation du sérum antidysentérique. (*Archives de Instituto Vital Brazil*, juin 1925, t. III, fasc. 1.)
- ARLINDO DE ASSIS ET N. O. MENDÈS. — Préparation du sérum antidysentérique sur le cheval. (*Scienza Medic.*, juin 1928, 6, 323.)
- BERDNIKOV (A.). — Sur la marche de la protéolyse dans les cultures de bacilles dysentériques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, p. 218.)
- BESREDKA. — De l'endotoxine soluble dysentérique. (*Ann. de l'I. P.*, 1906, p. 304.)
- D'un mécanisme de l'affection dysentérique. De la vaccination contre la dysenterie par voie buccale, et de la nature de l'immunité antidysentérique. (*Ann. de l'I. P.*, 1906, p. 304.)
- De la vaccination par voie buccale contre la dysenterie, la fièvre typhoïde, le choléra. (*Revue d'Hygiène et de Médecine préventive*, juin 1927.)
- BLAKE (A. V.) ET OKELL (C.). — Variation saisonnière dans la sensibilité des souris vis-à-vis de la toxine dysentérique. (*Brit. J. Exp. Path.*, 1929, p. 175.)
- BLANC (G.) ET CAMINOPETROS. — Vaccination antidysentérique chez l'homme par voie intra-musculaire. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, p. 509.)

- BROCKMANN (H.) ET PRZESMYCKI. — Sur la susceptibilité individuelle à la dysenterie. (*C. R. Soc. Biol.* 1925, p. 985.)
- CALALB. — Recherches sur les bacilles dysentériques isolés en Roumanie. (*Archives roumaines de Médecine expérimentale*, 1928, t. I, pè 243.)
- CLAVEL (Mme J.). — Etude analytique de la toxine diphtérique. (*Thèse de Lyon*, 1929.)
- COMIS (A.). — Action des fermentations lentes sur les toxines. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, p. 1031.)
- COMBIESCO (D.), MALGHEM (Alice) ET CALALB (C.). — Vaccination préventive par voie digestive contre la dysenterie chez le lapin. (*C. R. Soc. Biol.*, 1923, t. 88, p. 294.)
- CONRADI (H.). — Ueber eosliche, durche aseptische autolyse von zuhr. (*Deutsche Medicin Woch.*, 1903, Bd. 29-26.)
- COSTA, BOYER ET VAN DEINSE. — Vaccination antidysentérique collective par la voie digestive. (*Soc. Biol. Marseille*, 26 mai 1925.)
- COURMONT (P.) ET ROCHAIX. — L'immunisation par voie intestinale. (*Académie des sciences*, 20 mars 1911, p. 737.)
- DAMADE. — Vaccinothérapie par voie buccale. (*Thèse Paris*, 1922.)
- DANDY. — De la vaccination par voie gastro-intestinale contre le choléra, la dysenterie, etc. (*Thèse de Paris*, 1924.)
- DOERR. — Das dysenterie toxin. (*Wien Klinisch Woch.*, 1906.)
- DOPTER. — Effets expérimentaux de la toxine dysentérique sur le système nerveux. (*Ann. de l'I. P. P.*, 353, 1905.)
- Vaccination antidysentérique expérimentale. (*C. R. Soc. Biol.*, 1907, p. 369.)
- DOPTER, DUMAS (J.) ET COMBIESCO (D.). — Sur la nature de la toxine dysentérique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1922, p. 1140, t. 87.)
- Rapport sur les recherches, sur les méthodes de titrage du sérum autidysentérique. (*S. D. N., C. d'Hyg.*, 1922, Ch. 55-25.)
- DOPTER ET REPAIR. — La dysenterie bacillaire expérimentale par ingestion. (*C. R. Soc. Biol.*, 1910, p. 52.)

- DUMAS (J.), RAMON ET SAÏD BILAL. — Les propriétés immunisantes de l'anatoxine dysentérique. (*C. R. Acad. des sciences*, 27 juillet 1923.)
- FUKUHARA. — A new method of testing antitoxic dysentery serum. (*Journ. of Immunology*, 1919, p. 295.)
- FREZOULS. — Contribution à l'étude de la sérothérapie anticolibacillaire dans les infections urinaires. (*Thèse de Lyon*, 1931.)
- GABRITSCHESKI. — Ueber die technik der immunisierung von pferden gegen dysenterie. (*Centralbl F. Bakteriologie*, 1903, 34, 504.)
- GAUTIER. — Vaccination et vaccinothérapie par voie digestive contre la dysenterie bacillaire. (*Acad. Méd.*, 15 janvier 1924.)
- GLOTOW (E.). — De l'anatoxine dysentérique. (*Journ. de microb et de path. gén.*, Moscou, 1925, vol. II. 1.)
- HEIDELBERG ET FORREST, KENDALL (E.). — Action de l'anatoxine sur le mélange toxine-antitoxine. (*C. R. Soc. Biol.*, mai 1931, p. 37.)
- HIRSZFELD. — Rapport sur la standardisation des sérums antidyssentériques. (*S. D. N., C. d'Hyg.* 1922, CII/SS/16.)
- HIRSZFELD ET PRZESMYCKI. — Weiter untersuchungen ueber die standardisierung der dysenteriesera. *S. D. N., C. d'Hyg.*, 1924. CII/SS/37.)
- HORIMI (K.). — Méthode d'isolement et action spécifique et pathologique de la toxine dysentérique. (*Verhandl. d. japan, pathol. gesellsch.* Tokio, 1911.)
- HOSOYA (S.) ET STEPHANOPOULO (G.-J.). — Etude sur la nature et la purification de la toxine dysentérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, p. 1911.)
- Toxine dysentérique abiurétique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, p. 8.)
- JONESCO-MIHAESTI ET POPESCOL. — L'influence de la concentration en ions H sur le développement et la production de la toxine par le bacille dysentérique. (*C. R. Soc. biol.* 1922, t. 86, p. 853.)

- JONESCO-MIHAESTI ET COMBIESCO. — Premier rapport présenté par l'Institut sérologique de Bucarest (P^r Cantacuzène), sur le titrage de la toxine et du sérum antidysentérique. (*S. D. N., C. d'Hyg.*, 1924, CH/SS/45.)
- JONESCO-MIHAESTI, COMBIESCO, CONDREA ET G. CALALB. — Recherches sur le titrage du sérum antidysentérique. (*Arch. roumaines de Méd. exp. et microb.*, t. I, n° 2, juin 1928.)
- JONESCO-MIHAESTI ET A. DAMBOVICEANU. — Recherches sur la résistance des toxines diphtériques et dysentériques aux différentes concentrations en ions H. (*Arch. roumaines de Méd. exp. et microb.*, 115-121, 1928.)
- JUNGEBLUT (C.-W.). — Skin reaction induced in rabbits, guinea pigs, and goats by intracutaneous injection of dysentery toxin. (*J. immunology*, 427, juin 1927.)
- KABISHIMA. — Recherches expérimentales sur la vaccination préventive contre le bacille de Shiga. (*Acad. des sciences*, décembre 1917, p. 1061.)
- KIRSCHBAUM. — Chimie et toxicologie de la toxine dysentérique. (*Wiener, Klinisch Wochensh.*, mars 1914.)
- KLEIN. — Notiz ueber der dysenterie bazillus und der dysenterietoxin. (*Centralb. f. Bakt.*, 1906, p. 201.)
- KOLLE, HELLER ET DE MESTRAL. — Untersuchungen über Dysenterietoxin das Dysenterieserum und seine Wertbestimmung. (*Arbeiten Inst. Zur. Exp. der Infekt. Kran. Bern*, 1908.)
- KOLLE (W.). SCHLOSSBERGER ET PRIGGE. — Ueber Ligenchaften, wirkung und werbestimmung das Dysenterieserum. (*S. D. N., C. d'Hyg.*, 1924, 213.)
- KONDO ET SEIGO. — Titrage du sérum antidysentérique sur le lapin. (*Med. Klin.*, 22-773-776, 1926.)
- KRAUS, AWOKI ET KOVACS. — Immunieserum mit atoxichen kulturfiltraten II mitteilung Dysenteriebazillus Shiga-Kruse. (*Zeitsch. f. Immunit.*, 1925, n° 1.)
- KRUSE. — Weiter untersuchungen ueber die Ruhr und die Ruhrbazillus. (*Deutsche Med. Wasch.*, 1901, n. 386.)

- LE BOURDELLÈS ET SEDALLIAN. — Immunologie. (Masson 1929.)
- LEULIER, SEDALLIAN ET MME CLAVEL. — Conservation du pouvoir antigène dans la toxine diphtérique précipitée. (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, p. 1746.)
- LESBRE ET VERDEAU. — Quelques particularités sur l'antitoxine dysentérique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, p. 165.)
- LUDKE. — Ueber die Gewinnung von Dysenterietoxin. (*Berl. Klin. Woch.*, 1906, p. 54.)
- LURGE, ROSENBLATT ET KOSSAREW. — Anavaccin antidysentérique. (*Bull. Inst. Pasteur*, avril 1930, p. 363.)
- MAC CONKEY. — Notes of the standardisation of antidysentery serum. (*S. D. N. C. d'Hyg.*, 1924. CH/SS/38.)
- MUCKENFUSS (R. S.) ET KORB. — Toxin production by normal and by phage resistant Shiga dysenteriae bacilli. (*J. of Med. exp. Inst. Rockefeller*, août 1928, 48-277.)
- NEUFELD. — Sur le titrage du sérum antidysentérique. *S.D.N. C. d'Hyg.*, 1924. CH/SS/34.)
- NICOLLE, DEBAINS ET LOISEAU. — Etudes sur le bacille de Shiga. (*Ann. Inst. Past.*, 1916.)
- NICOLLE ET CONSEIL. — Vaccination par voie digestive chez l'homme contre la dysenterie bacillaire. (*Ann. Inst. Past.*, 1922, p. 579.)
- O'BRIEN, SUDMERSEN ET RUNGE. — Report II. Dysentery toxin and antitoxin and unitage of sera. (*S.D.N. C. d'Hyg.*, 1924. CH/SS/36.)
- OLITSKY ET KLIGLER. — Toxins and antitoxins of bacillus dysenteriae Shiga. (*Journ. of Exp. med.*, 1920, vol. 31, p. 17.)
- PATAY (R.). — Contribution à l'étude de la toxicité du bacille dysentérique de Shiga et de ses applications. (Immunitisation, floculation). (*Thèse de Paris*, 1926.)
- PEBBIE. — On the constitution of dysentery toxin and its relations to the testing of antidysentery serum. (*The British J. of Exp. path.*, t. 8, p. 183, 1927.)
- PRIBRAM. — Sur la toxine dysentérique. (*Centralblt. Bakt.*, 33, n° juin 1917.)

- RAMON (C.). — Sur la toxine et l'anatoxine diphtérique : pouvoir floculant et propriétés immunisantes. (*Ann. Inst. Past.*, 1924, p. 1.)
- Réaction de floculation dans les mélanges de toxine avec les sérums anti-correspondants. (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, t. I, p. 1033.)
- ROSENTHAL. — Das dysenterietoxin (auf natürlichen wege Gewonnen). (*Deutsch. Med. Woch.*, 11 février 1904.)
- SARDJITO (M.). — Production de toxine dysentérique aux différents PH. (*Gemesk Tydsch. V. Bed. Indie*, t. LXVI, 1926.)
- SCHLOSSBERGER ET HARTOCH (O.). — Weitere untersuchungen ueber die wertbestimmung das antitoxischen dysenterieserum. (*S. D. N., C. d'Hyg.*, 1924.)
- SCHLOSSBERGER ET WISCHMANN. — Untersuchungen über die Brindugs-Verhaltwisse von dysenterietoxin und dysenterie antitoxin. (*Ztschr. f. Hyg. Infekt.*, p. 718, 1927.)
- SCHMIDT (S.). — Toxines et antitoxines. Constitution et mode d'union. (*Ann. Inst. Past.*, p. 337-375, 1930.)
- SEDALLIAN ET Mlle GAUMOND — Sur l'isolement de la fraction active de la toxine diphtérique par abaissement du PH. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, p. 97.)
- SEDALLIAN ET VELLUZ. — Sur le mécanisme d'action des acides gras et en particulier des acides non saturés et de leurs savons sur les bactéries et les toxines. (*Bull. de la Soc. de Chimie biol.*, juillet 1927, n° 7.)
- SHIGA (K.). — Ueber der Dysenteriebacillus. (*Centralblt. f. Bakt.*, 1878, t. XXIV, p. 993.)
- Ueber versuche zur Schutzinpfung gegen die Ruhr. (*Deutsch. Med. Woch.*, 1903, t. I, p. 327.)
- Rapport sur le sérum antidysentérique. (*S. D. N., C. d'Hyg.*, 1922. CH/SS/8.)
- Vaccination per os contre les infections intestinales. (*Bull. Inst. Past.*, 1929, p. 363.)
- SHIGA (K.), KAWAMURA (H.) ET TSUCHIYA (K.). — The standardisation of Dysentery serum. T. Report. (*S. D. N., C. d'Hyg.*, 1924, CH/SS/193.)

- The standardisation of Dysentery serum. Second report. (*S. D. N., C. d'Hyg.*, 1924, CH/SS/193.)
- SORDELLI. — Emploi de petits oiseaux pour mesurer l'action de la toxine dysentérique et titrer le sérum. (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, p. 1245.)
- SUZAKI (K.). — Relations entre l'âge et l'influence de la toxine dysentérique et l'intestion du lapin. (*Bull. Inst. Pasteur*, avril 1929, p. 330.)
- TARRASEVITCH (L.), KOUNINA (E.) ET MAXAROWA (J.). — Titrage de la toxine dysentérique. (*S. D. N., C. d'Hyg.*, 1924. CH/SS/39.)
- THOTTA ET FALSEN SUNDT. — Toxins of bacteriæ dysenteriae. (*Journ. of Bact.*, 1921, vol. VI, p. 501.)
- TODD (G.). — On a dysentery toxin and antitoxin. (*Journ. of Hyg.*, 1904.)
- TRYGAL, SCHONFEDER. — Sérum antidysentérique, coagulé, résiduel et purifié. (*Bull. Inst. Pasteur*, 1926.)
- VAILLARD ET DOPTER. — Le sérum antidysentérique. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1906, p. 301.)
- VELLIZ — Modification des toxines par les aldehydes. (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, p. 745.)
- VIGANO (L.). — Intorno alle tossine ad antitossine dessenterica. (*Bollet. dell' Istituto seroterapico. Milano*, 1919.)
- VINCENT (H.). — La vaccination contre la dysenterie par l'étherovaccin. (*Revue d'Hygiène*, 1920, t. III, p. 657.)
- Action du palmitate de sodium sur la toxine dysentérique. (*Bull. Inst. Pasteur*, 1926.)
- YOSHIAKA. — Ueber das Bakteriengift, insbesondere die Läsungengifte des dysenterie. (*Zeitschr. f. Immun.*, 1923, p. 36-39.)
- ZANGGER (R.). — Zur Wertbestimmung der antidysenteriesera. (*Zeitschr. f. Hyg.*, 1924, p. 102-352.)
- ZOELLER. — L'immunisation antidysentérique, une forme de l'immunité antitoxique. (*Soc. méd. des Hôpitaux*, 1927, p. 332.)
- ZOELLER ET LESBRE. — Intradermo-réaction à la toxine dysentérique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, p. 631.)

Table des Matières

	Pages
Avant-propos,	
Introduction	11
CHAPITRE PREMIER.	
HISTORIQUE	13
Etude de la toxine dysentérique	15
CHAPITRE II.	
L'ACTIVITÉ TOXIQUE	17
Préparation de la toxine	17
Les animaux récepteurs	19
Les doses toxiques	22
Expériences personnelles	29
Toxicité chez l'homme	31
La maladie expérimentale	33
Conclusion	37
CHAPITRE III.	
LE POUVOIR ANTIGÈNE	39
Méthodes d'atténuation	42
L'Anatoxine	44
Vaccination des animaux	49
Vaccination humaine	52
Conclusion	55

CHAPITRE IV.

L'ANTITOXINE	57
Titrage des sérums	58
Technique	61
Toxine d'épreuve	63
Titrages effectués à l'Institut Bactériologique.	67
Méthode de floculation	72

CHAPITRE V.

NATURE DE LA TOXINE DYSENTÉRIQUE	75
Identité de l'endotoxine et de l'exotoxine ..	75
Neurotropisme et entérotropisme	78
Purification de la toxine	80
Ultrafiltration	80
Précipitation	82
Essai de précipitation au PH 4,7	83
Essai sur la formation et sur la constitution de la toxine dysentérique	88
Conclusions	91
Bibliographie	95
